

Del fenotipo al genotipo en una familia con CMT2P/*LRSAM1*: una visión histórica del seguimiento a lo largo de cuatro décadas

J. Berciano¹, A. Jordanova^{2,3,4}

¹Profesor Emérito *ad honorem*. Universidad de Cantabria, Santander, España. Ex jefe de servicio, Servicio de Neurología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Santander, España y Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Degenerativas (CIBERNED), Santander, España.

²Grupo de Neurogenómica Molecular. VIB-UAntwerp Center for Molecular Neurology, Amberes, Bélgica.

³Departamento de Ciencias Bioquímicas. Universidad de Amberes, Amberes, Bélgica.

⁴Departamento de Química Médica y Bioquímica. Universidad de Medicina de Sofía, Sofía, Bulgaria.

RESUMEN

Objetivo. Revisamos los estudios de seguimiento realizados por los autores en una familia con enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2 (CMT2) de herencia dominante.

Desarrollo. La familia inicial (1977-1985) incluía 10 individuos afectados de tres generaciones diferentes y 17 individuos no afectados con riesgo de presentar la enfermedad. El cuadro clínico consistía en un síndrome de atrofia muscular peroneal leve con penetrancia incompleta en las dos primeras décadas de vida. Los estudios histopatológicos mostraron que la enfermedad subyacente es una neuropatía sensitivomotora lumbosacra con axonopatía dependiente de la longitud. Se realizó un mapeo preliminar del cromosoma 12q12 (CMT2G) en 2004. Posteriormente, tras realizar estudios clínicos, electrofisiológicos y de RM seriados de los músculos de la pantorrilla y el pie, se replanteó el cuadro clínico, de tal forma que para 2016 ya se habían identificado 13 individuos afectados. A partir de este árbol genealógico modificado, redefinimos la región asociada a la enfermedad en el cromosoma 9q y posteriormente identificamos una nueva variante de cambio de sentido (*missense*) en *LRSAM1*, p.Cys694Tyr, que codifica la enzima ligasa E3 de la proteína ubiquitina. Esta mutación no afecta a los niveles totales de la proteína *LRSAM1*, ni a los de su diana ubiquitinizada TSG101. La mutación se asocia con varios cambios transcripcionales, como la sobreexpresión de otra ligasa E3 de ubiquitina-proteína, NEDD4L, y de TNFRSF21, una proteína clave en la regulación de la degeneración axonal.

Conclusiones. El estudio longitudinal de esta gran familia con CMT2 con penetrancia incompleta ilustra el enorme valor de este tipo de estudios para una definición fenotípica fiable. Esto ha permitido la identificación de la variante genética causal, y atestigua la estrecha y duradera coordinación entre médicos españoles y genetistas belgas. Nuestros hallazgos demuestran que CMT2G, considerada independiente, está causada por una mutación *missense* en *LRSAM1* y debería ser reclasificada como CMT2P.

PALABRAS CLAVE

Degeneración axonal, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2 (CMT2), CMT2G, CMT2P, electrofisiología, penetrancia incompleta, *LRSAM1*, RM, neuropatía, secuenciación de nueva generación, atrofia muscular peroneal, pie cavo, cambios transcripcionales

Introducción

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es la neuropatía hereditaria más frecuente, con una prevalencia de 28,2 casos por 100 000 habitantes en Cantabria¹. Se caracteriza principalmente por atrofia y debilidad

progresivas de la musculatura distal y pie cavo²⁻⁵. La CMT se clasificó inicialmente según el modo de herencia (autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al cromosoma X, o mitocondrial) y los hallazgos electrofisiológicos o de biopsia del nervio. Particularmente, las velocidades de conducción motora (VCM) en el nervio

mediano son de < 38 m/s en las formas desmielinizantes (CMT1) y de > 38 m/s en las formas axonales (CMT2)²⁻⁵. Puede existir una forma intermedia, con VCM entre 25 y 45 m/s^{6,7}. La CMT es una entidad compleja desde el punto de vista clínico y genético; se han reportado mutaciones causales en más de 120 genes gracias a la reciente introducción de la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) en la práctica diagnóstica rutinaria⁸⁻¹⁰.

El principal objetivo de este estudio es proporcionar una visión general de una familia española con CMT2 de herencia autosómica dominante, a la que se ha seguido durante más de cuatro décadas¹¹⁻¹³. El diagnóstico genético preciso, CMT2P/*LRSAM1*, no habría sido posible sin un seguimiento a largo plazo de los pacientes y los familiares con riesgo, dado que la enfermedad en esta familia mostraba un patrón muy marcado de penetrancia incompleta. La descripción de los casos y las ilustraciones se corresponden con nuestras descripciones originales y se presentan en orden cronológico de estudio.

Evaluación inicial del árbol genealógico de la familia AC: estudio clínico-patológico (1977-1986)

Características clínicas

Diez individuos afectados y 17 no afectados de una única familia de Cantabria (figura 1) fueron evaluados por uno de los autores (JB) entre 1977 y 1985¹¹. La presencia de la enfermedad en la familia era consistente con un patrón de herencia autosómica dominante. Siete de los 11 miembros con riesgo pertenecientes a la tercera generación, de edades entre los 22 y los 41 años, presentaban la enfermedad. Sin embargo, solo uno de los 10 miembros con riesgo de la cuarta generación, con edades entre uno y 15 años, estaba afectado. Esta proporción es significativamente diferente de la esperada de 1:1 ($\chi^2 = 8,20$; $p < 0,01$).

Las características clínicas de los 10 miembros afectados ya se habían analizado previamente (ver tabla 1 en Berciano et al.¹¹), pero se actualizan y se vuelven a presentar en este trabajo. Las edades de estos 10 miembros afectados oscilaban entre los ocho y los 78 años, con una edad media de 38 años. La mayoría desarrollaron los síntomas durante la segunda década de vida y tan solo dos pacientes presentaron los síntomas antes o después de esa franja de edad. Dos individuos eran asintomáticos, pero presentaban signos clínicos sutiles. Los principales síntomas iniciales fueron pie cavo (figura 2) y dificultad para

caminar. La discapacidad de los individuos afectados era leve o moderada; de hecho, no se observaron cambios en su estado neurológico a lo largo de las evaluaciones realizadas entre 1977 y 1985. Presentaban leve hipoestesia en calcetín, que afectaba principalmente a la sensibilidad vibratoria. La debilidad muscular y la amiotrofia se limitaban a los músculos pequeños de los pies y a veces a los músculos de las piernas, especialmente los extensores del pie; solo un individuo presentó el clásico signo de “patas de cigüeña” (figura 2). También se observaba arreflexia en los miembros inferiores. Tres pacientes (casos II-4, III-5 y III-7; figura 1) necesitaron cirugía ortopédica en los pies. El caso III-5 sufrió una fractura conminuta de los cóndilos medial y lateral de la tibia derecha en 1980, complicada por una úlcera plantar dolorosa y osteomielitis en los huesos del tarso y del metatarso. Tras un curso clínico prolongado, se le amputó la pierna derecha en febrero de 1985 (más adelante se describen los hallazgos del estudio histológico de los nervios de la pierna). No se observaron atrofia muscular de la mano, escoliosis, engrosamiento de nervios, alteraciones pupilares, sordera, atrofia óptica, temblor ni ataxia. Los resultados de los análisis de laboratorio habituales y de ECG fueron normales.

Caso III-7 (paciente índice)

El paciente índice, un varón de 32 años, acudió a consulta en 1977 a causa de una deformidad progresiva del pie derecho. Consumía una gran cantidad de tabaco (más de 40 cigarrillos al día). A los 17 años fue intervenido quirúrgicamente por pie cavo. En una exploración realizada cuando tenía 29 años, el paciente presentaba pie cavo bilateral y atrofia muscular distal en las piernas, especialmente en la derecha (figura 3)^{11,14}. Presentaba reflejos tendinosos abolidos en las piernas y normales en los brazos, así como leve hipoestesia en calcetín. Se volvió a evaluar al paciente en 1978 y 1979, sin detectarse cambios. En abril de 1980 fue ingresado a causa de disnea subaguda progresiva. De nuevo, no se detectaron cambios en el examen neurológico. Una radiografía de tórax reveló una masa en el pulmón izquierdo. El paciente falleció a las tres semanas del ingreso. La autopsia general mostró un carcinoma de células pequeñas (tipo “oat cell”) con metástasis en los ganglios linfáticos regionales, el hígado, el bazo, las glándulas suprarrenales y la médula ósea.

Estudios electrofisiológicos

Los resultados de los estudios electrofisiológicos se presentan en detalle más adelante, a partir de los datos de estudios de seguimiento realizados entre 2011 y 2015. Hasta 1985, los estudios de conducción nerviosa (motora y sensitiva) iniciales se realizaron en los nervios mediano y peroneo en todos los individuos afectados excepto dos. Los resultados, que se presentan en la tabla del artículo de Berciano et al.¹¹, se pueden resumir del siguiente modo: *i*) las amplitudes de los potenciales de acción nerviosos sensitivos (PANS) del nervio mediano mostraron una reducción moderada (22%-58% respecto a lo normal) en seis pacientes adultos y fueron normales en dos adultos jóvenes; *ii*) dos pacientes mostraron un ligero enlentecimiento de la velocidad de conducción sensitiva (VCS); *iii*) se estudiaron los PANS del nervio peroneo en cinco pacientes; no se pudieron obtener en un caso y mostraron una amplitud reducida (33%-66% respecto al nivel normal) en los cuatro restantes; *iv*) las latencias motoras distales (LMD) fueron normales en el nervio mediano en todos los casos, y ligeramente prolongadas en el nervio peroneo; y *v*) las VCM fueron normales en el nervio mediano y ligeramente reducidas en el nervio peroneo.

Se realizó electromiografía del músculo tibial anterior en 10 individuos afectados, que demostró un patrón de denervación crónica.

Entre 1977 y 1985 se repitieron los estudios electrofisiológicos en siete pacientes, sin detectarse cambios significativos.

Estudios de anatomía patológica

Se estudió el siguiente material de anatomía patológica: *i*) autopsia del paciente índice (caso III-7, figura 1¹¹); *ii*) disección de los nervios de la pierna amputada en el caso III-5, de la que se obtuvieron muestras de los tercios superior, medio e inferior de los nervios peroneo profundo (tibial anterior) y tibial posterior, así como de sus ramas distales (rama terminal lateral y rama plantar medial); y *iii*) muestras de nervio sural de los casos III-5 y III-7.

En la autopsia, el examen macroscópico mostró una médula espinal y raíces nerviosas normales. La figura 4¹¹ muestra los principales hallazgos en la médula espinal, raíces nerviosas y ganglios espinales. La sustancia gris del asta anterior era normal a nivel cervical y torácico. Se observó pérdida de neuronas motoras (figura 4A¹¹)

y gliosis a nivel lumbosacro; las neuronas motoras con frecuencia mostraban signos de atrofia, pero no se observaron ni cromatólisis central ni neuronofagia. Los cuatro ganglios espinales estudiados (L3-S1) mostraban una marcada reducción de células ganglionares, proliferación de células capsulares y nódulos residuales de Nageotte (figura 4C¹¹). Las raíces ventral y dorsal a nivel de L5 mostraban una pérdida de fibras mielínicas grandes, especialmente en la raíz dorsal (figura 4B y D¹¹). Solo se realizó una evaluación morfológica de las raíces espinales a nivel de L5 (Material Suplementario figura S1a y b¹¹). La proporción de fibras grandes ($\geq 8 \mu\text{m}$) en las raíces ventral y dorsal era significativamente menor que en los controles ($p < 0,001$). Había racimos de pequeñas fibras en regeneración (figuras 4B y 5A¹¹; para la cuantificación del número de racimos, ver Berciano et al.¹¹). También se observaban ocasionalmente algunos axones atroficos (figura 5B¹¹).

El hallazgo patológico más llamativo de los nervios periféricos estudiados fue la reducción del número de fibras mielínicas (figura 6¹¹). El histograma mostró una distribución unimodal del diámetro en todos los nervios, a causa de la desaparición de las fibras mielínicas de mayor calibre (Material Suplementario figura S1c y d¹¹). Se observó un gradiente proximal a distal de pérdida de fibras en los nervios peroneo y tibial posterior. También se observaron racimos regenerativos (figura 6¹¹).

Etapas definitivas: redefinición fenotípica, inicio de la era molecular e identificación de la variante patogénica (1987-2015)

En las tres décadas siguientes, se produjo una serie de avances que nos permitieron delimitar con mayor precisión el fenotipo e identificar una variante patogénica de LRSAM1. Como anteriormente, seguiremos el orden cronológico de estos acontecimientos.

La colaboración entre la Dra. Anita Harding y el Dr. José Berciano

En 1983, Combarros et al.¹⁵ describieron cuatro familias con CMT1, que comprendían 47 individuos estudiados: 26 afectados y 21 no afectados. Cuatro años más tarde, la Dra. Anita Harding (Institute of Neurology, Queen Square, Londres) solicitó nuestra colaboración para realizar un análisis de ligamiento genético en árboles genealógicos informativos de CMT1, y finalmente también en la familia AC (CMT2) que se presenta en este trabajo. Los

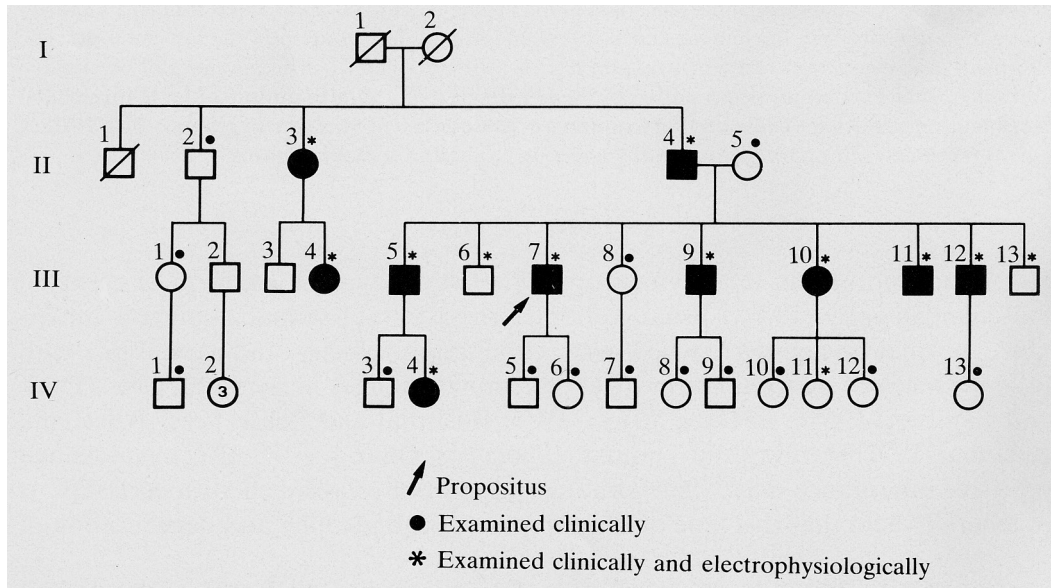


Figura 1. Árbol genealógico de la familia AC tal y como se reportó en el artículo de Berciano et al.¹¹.



Figura 2. A) Fotografías del caso III-5, obtenidas a la edad de 34 años, que muestran atrofia de los músculos peroneos (“patas de cigüeña”). B-C) En los primeros planos de los pies se observa pie cavo, con dedos en garra y callosidades en la parte delantera de las plantas de los pies. Nótese también las cicatrices de la cirugía ortopédica de los pies (B). Imágenes inéditas.

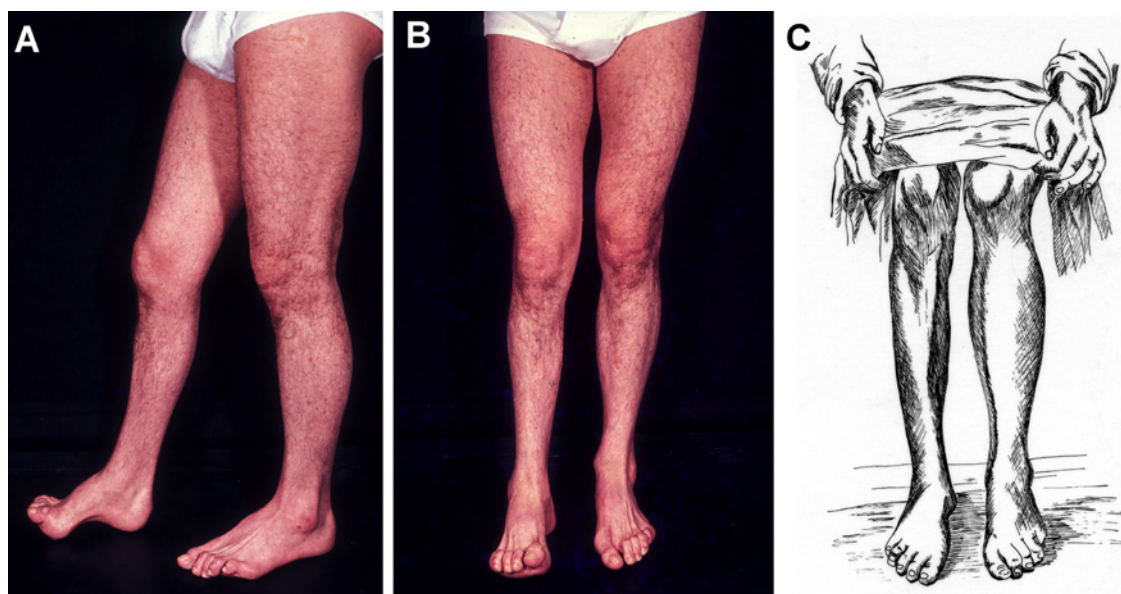


Figura 3. A-B) Fotografías del paciente índice, que muestran atrofia asimétrica de los músculos peroneos. C) La imagen es extraordinariamente parecida a la del caso II de Tooth¹⁴ (dibujo inspirado en el original). Tomado de Berciano et al.¹¹.

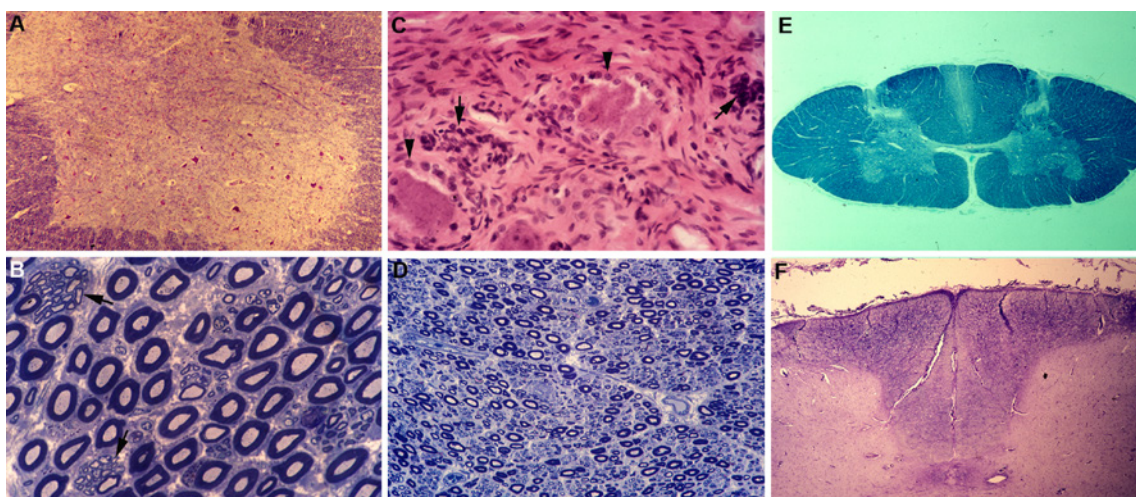


Figura 4. A) Sección transversal de la médula espinal a nivel del segmento S1, que muestra pérdida de células motoras en el asta anterior acompañada de gliosis (KB; magnificación original $\times 250$ antes de la reducción). B) Sección semifina transversal de la raíz ventral L5 que muestra dos racimos regenerativos (flechas); a este elevado aumento no se aprecia la pérdida de fibras mielínicas (azul de toluidina, magnificación original $\times 1000$ antes de la reducción). C) Ganglio espinal lumbar que muestra degeneración de los cuerpos neuronales, con proliferación de células capsulares (puntas de flecha) y nódulos de Nageotte residuales (flechas) (H-E, magnificación original $\times 400$ antes de la reducción). D) Sección semifina de la raíz dorsal L5, que muestra una reducción de fibras mielínicas grandes; las más pequeñas están aumentadas (azul de toluidina, magnificación original $\times 400$ antes de la reducción). Se pueden consultar los histogramas de las fibras mielínicas de las raíces L5 en la figura S1a del Material Suplementario. E) Sección transversal de la médula espinal a nivel de C5, que muestra desmielinización bilateral del fascículo grácil (KB, magnificación original $\times 25$ antes de la reducción). F) Sección transversal de la médula espinal a nivel de S1, que muestra gliosis pronunciada de las columnas posteriores (Holzer, $\times 100$ antes de la reducción). Adaptado de Berciano et al.¹¹

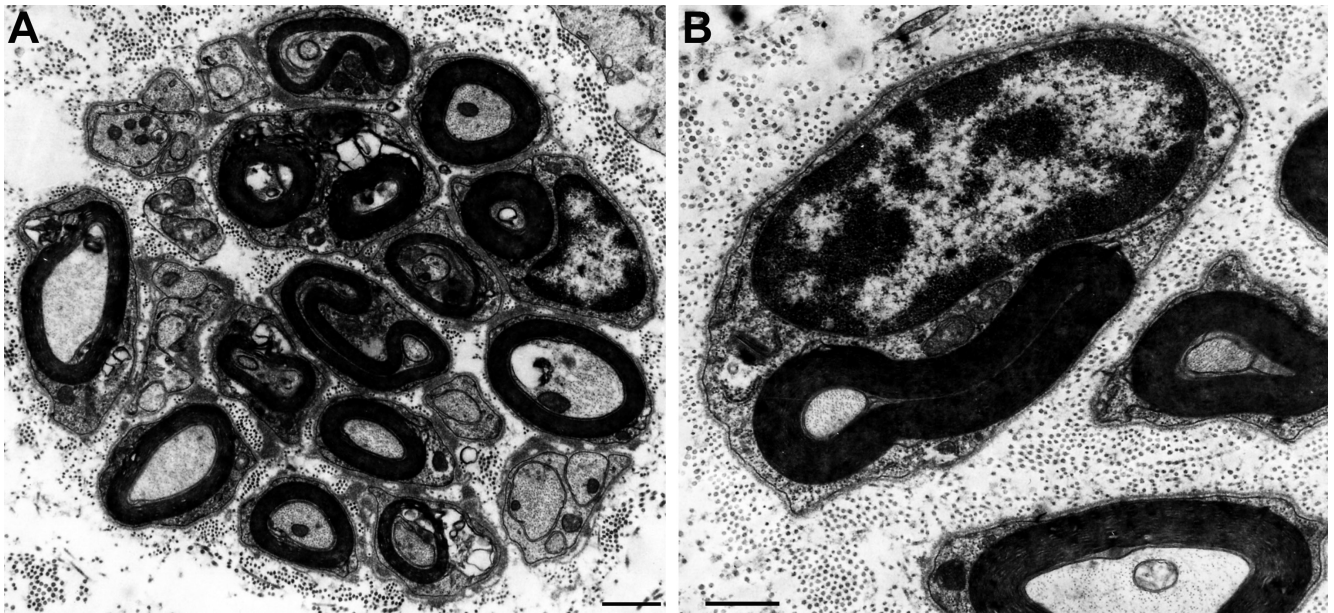


Figura 5. Micrografías electrónicas de la raíz ventral de L5. A) Racimos regenerativos que contienen axones mielinizados y no mielinizados. B) Axón atenuado en una fibra mielínica. Barra de escala: 1 μ m. Tomado de Berciano et al.¹¹.

resultados de dichos análisis de ligamiento genético de CMT1 fueron, por este orden, los siguientes: *i*) ausencia de ligamiento con marcadores del cromosoma 1¹⁶; *ii*) confirmación del ligamiento con la región pericentromérica del cromosoma 17¹⁷; y *iii*) confirmación de una duplicación de ADN en 17p11.2 como causa de CMT1A¹⁸. Como cabría esperar, dos familias con CMT2 (una de ellas, la familia AC) no mostraron la duplicación de CMT1A.

De Londres a Amberes

Tras la prematura muerte de la Profesora Anita Harding en 1995, a la edad de 43 años, se trasladaron muestras de ADN de la familia AC al laboratorio de neurogenética de la Universidad de Amberes, liderado por la Dra. Christine van Broeckhoven. Su laboratorio era un centro pionero tras haber descubierto que la base genética de CMT1A era una duplicación en el cromosoma 17p11.2¹⁹, y tras el lanzamiento del European CMT Consortium. Durante el trascurso de la séptima reunión de la European Neurological Society, celebrada en Rodas (Grecia) del 14 al 18 de junio de 1997, la

Dra. van Broeckhoven contactó a uno de los autores (JB) para confirmar que las muestras de ADN recibidas de Londres pertenecían a la familia AC española, como efectivamente era el caso, dado que el árbol genealógico correspondiente era el que JB había dibujado a mano cuando realizó el primer envío de Santander a Londres en 1987. De vuelta en Santander, JB envió a la Dra. van Broeckhoven una copia del material clínico y patológico publicado sobre esta familia¹¹. JB se comprometió a realizar una actualización clínica de los pacientes y de los sujetos con riesgo en los siguientes meses.

En 2002, el árbol genealógico de la familia AC se actualizó para añadir un nuevo miembro afecto perteneciente a la tercera generación (caso III-20) y otros cuatro casos en la cuarta generación (IV-5, IV-9, IV-10 y IV-11) (Material Suplementario figura S2^{12,13}). Basándose en este árbol genealógico actualizado, Nelis et al.¹² realizaron un mapeo de ligamiento de genoma completo, e identificaron un ligamiento con el marcador del cromosoma 12q13.13. Un mapeo más exhaustivo localizó este nuevo locus en una región de 13,2 Mb (12,8 cM) entre D12S1663 y D12S1644, en el cromosoma 12q12-q13.3.

Se excluyeron los genes candidatos *AVIL*, *CENTG1*, *RAB5B* y *DHH*. Se concluyó que la neuropatía CMT2 en esta familia era una nueva entidad genética, que se designó CMT2G.

Estudios clínicos consecutivos en Santander y análisis genéticos moleculares en Amberes, en paralelo

En los años siguientes se sucedieron una serie de avances, que resumimos a continuación:

— Introducción de la puntuación de neuropatía de CMT (CMTNS, por sus siglas en inglés), que, usando parámetros clínicos y electrofisiológicos, proporciona una medida única de la discapacidad causada por CMT. La puntuación en la escala CMTNS oscila entre 0 y 36 puntos, y el grado de afectación de CMT se clasifica como leve (puntuaciones ≤ 10), moderado (11-20) y grave (≥ 21). Cabe mencionar que la escala CMTNS es una herramienta validada de evaluación de la discapacidad causada por CMT, tanto en las formas desmielinizantes como en las axonales dependientes de la longitud; la puntuación puede utilizarse como criterio de valoración clínico en estudios longitudinales y ensayos clínicos sobre CMT^{20,21}.

— El pie cavo es de las principales manifestaciones de CMT^{2-5,22-26}. En base a nuestros estudios electrofisiológicos longitudinales en niños con CMT1A, propusimos que el pie cavo anterior resulta de la denervación de los músculos intrínsecos del pie, especialmente los lumbricales²³⁻²⁵. Posteriormente, esta hipótesis sobre la fisiopatología de la enfermedad fue confirmada con estudios de RM de los músculos de la pierna y el pie de pacientes con CMT1A. En pacientes con afectación leve según la CMTNS, la atrofia muscular grasa afectaba de forma predominante o exclusiva a la musculatura intrínseca del pie²⁷.

— Tras su disponibilidad comercial a partir de 2005, NGS facilitó en gran medida el diagnóstico genético de CMT^{8,28}. Esta tecnología permite la secuenciación paralela de alto rendimiento de genes seleccionados (paneles), de todas las secuencias codificantes de proteínas (*whole exome sequencing* [WES]), o del genoma completo (*whole-genome sequencing* [WGS]).

La búsqueda de genes en la familia AC

En 2010, Guernsey et al.²⁹ estudiaron una familia grande con CMT2 autosómica recesiva y encontraron una mutación homocigota en el sitio de empalme en el gen

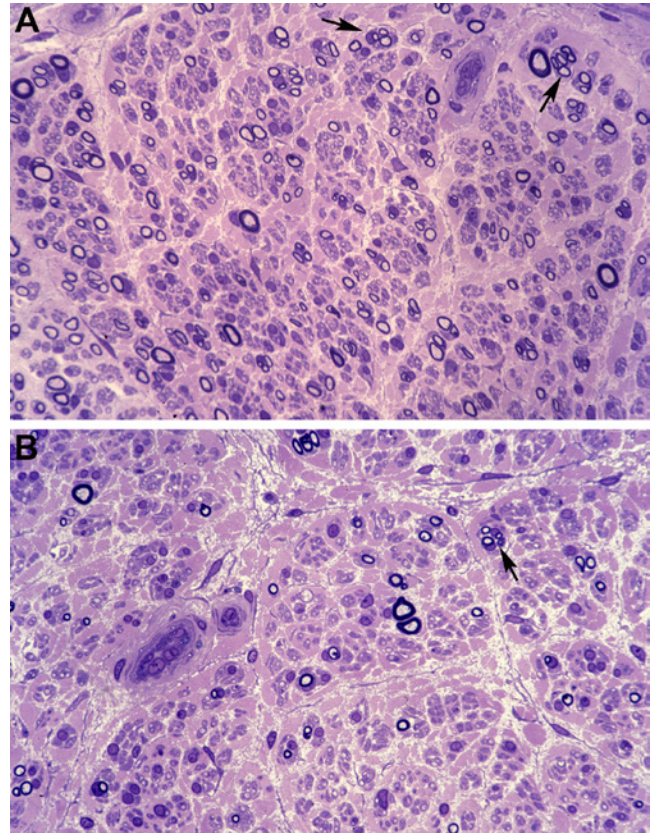


Figura 6. Estas imágenes ilustran el hallazgo anatomopatológico característico en el nervio tibial posterior del caso III-5. Secciones semifinas transversales de los tercios superior (A) e inferior (B) del nervio, que revelan una pérdida de fibras mielínicas con un claro gradiente proximal a distal. Nótese que la densidad de las fibras mielínicas es mucho menor que la observada en las raíces lumbares (ver figura 4). Varias fibras contienen vainas de mielina delgadas en comparación con el diámetro del axón, un hallazgo sugestivo de remielinización. También se aprecian racimos regenerativos (flechas) (azul de toluidina, $\times 250$ antes de reducción). Adaptado de Berciano et al.¹¹.

LRSAM1 (leucine-rich repeat- and sterile alpha motif-containing 1), localizado en el cromosoma 9q33.3-q34.1 (OMIM 614436). Los portadores heterocigotos de la mutación no presentaban la enfermedad. Poco después, en el departamento de genética molecular de la Universidad de Amberes, se realizaron estudios de genética molecular y de genómica de la familia AC, cuyos resultados se detallan en el estudio de Peeters et al.¹³. En resumen, se realizaron los siguientes análisis: hibridación genómica comparativa del locus CMT2G, análisis de ligamiento, análisis de ligamiento de genoma completo, y WES/WGS de los casos II-2 y III-1 (figura 7A¹¹⁻¹³). Sin embargo, no

se identificó ninguna mutación causal en el locus 12q12-q13-3. Este hallazgo genético nos obligó a actualizar, entre 2011 y 2025, los datos clínicos, electrofisiológicos y de imagen, y a reevaluar las características moleculares de los individuos con riesgo, independientemente de que fuesen sintomáticos o que solo mostrasen signos clínicos de atrofia muscular peroneal.

Hallazgos clínicos

En primer lugar, cabe señalar que los casos II-1 y II-2 y sus descendientes, y los descendientes del caso II-3 se excluyeron del árbol genealógico actualizado (compárense las figuras 1 y 7A)^{11,13}. Para evitar errores de interpretación en la genealogía de esta familia, al mencionar casos específicos nos referiremos a las figuras con representación genealógica (figuras 1 y 7^{11,13} o Material Suplementario figura S2^{12,13}). La tabla 1 resume los datos clínicos actualizados de los últimos estudios, realizados entre 2011 y 2015 en los 11 miembros afectados¹³. Esto nos permitió identificar nuevos casos en la cuarta generación (casos IV-1, IV-10 y IV-2), y también excluir casos previamente considerados afectados (III-12, III-14, IV-8 y IV-9) (compárense los árboles genealógicos en las figuras 7A¹¹⁻¹³ y Material Suplementario figura S2^{12,13}). Cuatro pacientes (II-1, II-2, III-1 y III-4 de la figura 7A¹¹⁻¹³) murieron por causas no relacionadas con la enfermedad; ninguno de ellos había experimentado progresión en la debilidad de los músculos de las piernas. Los dos pacientes reevaluados pertenecientes a la tercera generación (III-8 y III-10) mostraron dificultad progresiva para caminar, que no requería ortesis de tobillo y pie ni de otros dispositivos ortopédicos; su grado de afectación según la escala CMTNS era leve o moderado (tabla 1¹³). Todos los miembros afectados de la cuarta generación han permanecido asintomáticos, con grado de afectación leve según la escala CMTNS. Dos pacientes (casos IV-4 y IV-11 de la figura 7A¹¹⁻¹³) presentaban pie cavo, hipoestesia en calcetín y arreflexia en los miembros inferiores. Se observó progresión no sintomática de la atrofia de los miembros inferiores en el paciente IV-4 (figura 8A-D¹³). La figura 8E-I¹³ muestra a la paciente IV-11, que presenta mínima afectación clínica: pie cavo anterior, dedos en garra, hipoestesia en calcetín y arreflexia del tobillo. El resto de pacientes de la cuarta generación presentaban pie cavo aislado o ningún signo de la enfermedad.

Nuestras cuatro evaluaciones clínicas longitudinales nos llevaron a reclasificar algunos casos^{11,12}. El paciente III-12 (figura 7A¹¹⁻¹³) es un varón de 57 años con pie cavo e

hipoestesia en calcetín muy leve. A la edad de 26 años, el único hallazgo electrofisiológico fue una reducción de la amplitud de los PANS en los nervios peroneos (0,5 μ V; rango normal: $\geq 1,5$); se le consideró afecto (caso III-16 en la figura 2 del Material Suplementario)¹¹⁻¹³. Los estudios seriados (el último se realizó en 2014) no encontraron signos de la enfermedad, salvo por pie cavo muy leve. Además, los resultados de un estudio electrofisiológico de seguimiento, que evaluó parámetros motores y sensitivos del nervio peroneo, fueron normales. Por tanto, se le reclasificó como no afecto. El caso III-14 (figura 7A¹¹⁻¹³) es un varón de 53 años que fue evaluado inicialmente a la edad de 13 años, momento en el que presentaba únicamente pie cavo leve y una dudosa hipoestesia en calcetín; los reflejos tendinosos estaban preservados y la fuerza de los músculos dorsiflexores y eversores del pie era normal. En nuestro estudio de 2004¹², se le consideró un miembro afecto (caso III-20 de la figura S2 del Material Suplementario^{12,13}). La conducción nerviosa era normal. No se detectaron cambios a lo largo de 20 años, por lo que se le ha reclasificado como no afecto.

Otros dos casos merecen mención especial: dos hermanas (caso IV-8, mujer nacida en 1976, y caso IV-9, hombre nacido en 1979) se clasificaron como no afectados en el árbol genealógico original (figura 1)¹¹ y como afectados en el de Nelis et al.¹² (Material Suplementario figura S2; casos IV-9 y IV-10^{12,13}). La paciente IV-8 presentó resultados normales en el primer examen, realizado cuando tenía seis años; sin embargo, en exámenes posteriores, realizados entre 1986 y el año 2000, se observó pie cavo, a pesar de los resultados normales en los estudios de conducción nerviosa. En la evaluación realizada en 2011, cuando la paciente tenía 35 años, presentó resultados normales en los exámenes clínicos, exceptuando la presencia de pie cavo muy leve, así como en los estudios de conducción nerviosa y de RM de los músculos del pie y la parte inferior de la pierna (ver más adelante). Por tanto, actualmente se la considera no afecta (caso IV-8 en figura 7¹¹⁻¹³). El paciente IV-9 de las figuras 1 y 7A^{11,13} tenía 35 años en 2014. Desde la evaluación inicial solo presentaba pie cavo leve y una incipiente deformidad de dedos en garra; en 2002 se le consideró posiblemente afecto (caso IV-10 en Material Suplementario figura S2^{12,13}). En un examen realizado en 2014, el paciente no presentaba dificultad para la marcha de talones y la fuerza de los músculos flexores y extensores del pie era normal. Los reflejos aquileo y rotuliano estaban preservados y los resultados de los estudios de conducción nerviosa eran

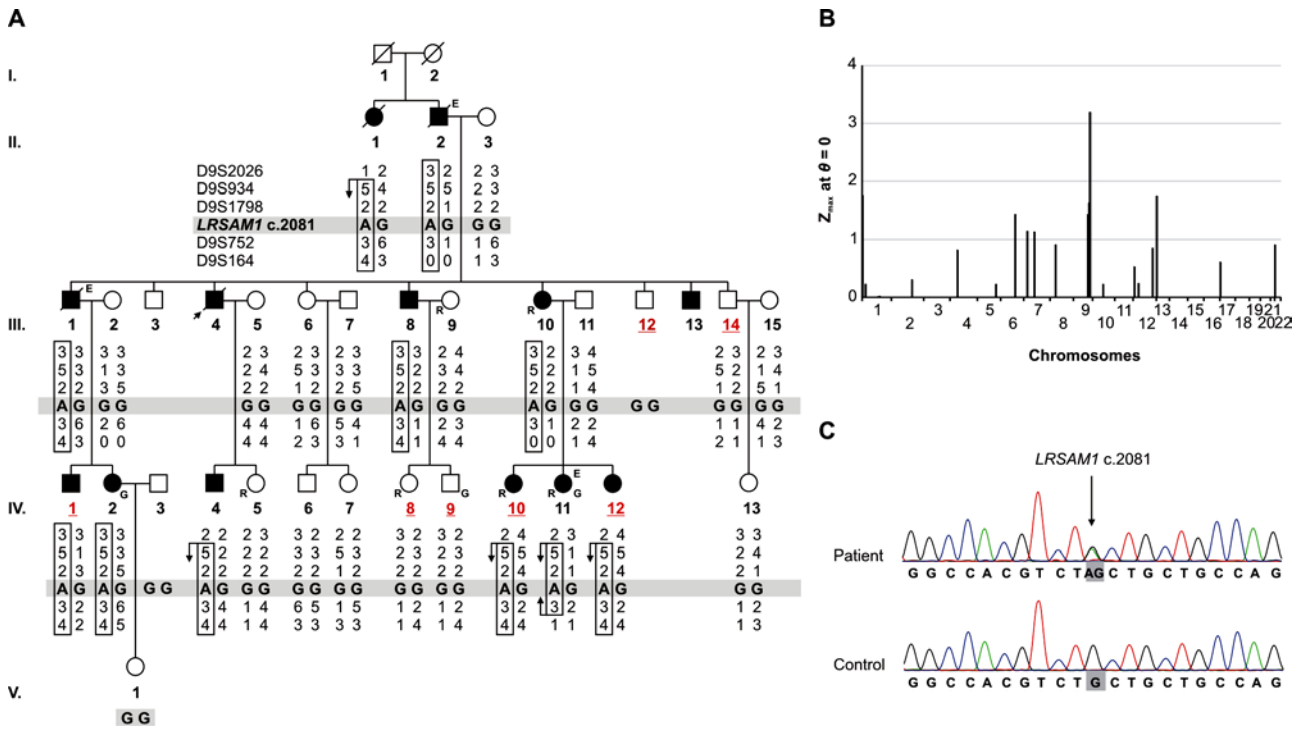


Figura 7. A) Árbol genealógico actualizado y análisis del haplotipo de la familia española AC en 2015. Para facilitar la interpretación de los individuos con riesgo a los que se les estaba realizando un estudio molecular, se ha modificado la estructura del árbol genealógico con respecto a los árboles genealógicos propuestos en el estudio clínico-patológico inicial¹¹ (ver figura 1) y en la descripción de CMT2G (ver Material Suplementario figura S2^{12,13}). Los hombres están representados con cuadrados y las mujeres con círculos. Los símbolos negros indican individuos afectados. Las etiquetas subrayadas indican que el individuo ha sido reclasificado (de no afecto a afecto, o viceversa) tras una reevaluación clínica. Los individuos a los que se realizaron estudios WGS, WES o de secuenciación de ARN se indican con las letras G, E y R, respectivamente. El análisis del haplotipo indica un haplotipo ligado a la enfermedad en el cromosoma 9. B) Gráfico que representa los resultados del análisis de ligamiento paramétrico de dos puntos del genoma completo. Nótese que desapareció el pico de ligamiento inicial correspondiente a CMT2G en el cromosoma 12, y apareció una nueva región de ligamiento concluyente en el cromosoma 9q31.3-q34.2 ($Z_{\max} = 3,186$ para $\theta = 0$). C) Electroferograma de la posición genómica c.2081 de *LRSAM1* en un paciente y un control, que muestra una transición G>A heterocigota en el paciente. Tomado de Peeters et al.¹³

normales. Cabe señalar que se dedicaba profesionalmente al fútbol. Dada su mínima semiología y la ausencia de progresión a lo largo de dos décadas de seguimiento, concluimos que este individuo no estaba afectado por la enfermedad.

Hallazgos electrofisiológicos

Se actualizaron los estudios electrofisiológicos de ocho individuos afectados (tabla 2; la denominación de los casos se corresponde con la de la figura 7A)¹¹⁻¹³. Además de una reducción aislada en la amplitud de los PANS del nervio mediano, posiblemente asociada a un síndrome del túnel carpiano, dos pacientes (casos IV-1 y IV-12) presentaron resultados normales en los estudios de conducción nerviosa. Además, la electromiografía con aguja

(músculos tibial anterior y extensor corto de los dedos en el caso IV-1 y solo del extensor corto de los dedos en el caso IV-12) no detectó cambios. En los seis pacientes restantes, el hallazgo más común fue la reducción en la amplitud de los PANS en los nervios mediano, cubital y sural. Los potenciales de acción muscular compuestos (PAMC, por sus siglas en inglés) en los nervios cubital y mediano estaban preservados en todos los casos, mientras que en los nervios tibial y/o peroneo se encontraban atenuados en cuatro pacientes. Las VCM y VCS eran normales o estaban ralentizadas en rango axonal; asimismo, las LMD eran normales o ligeramente prolongadas. La electromiografía del extensor corto de los dedos mostró un patrón de denervación crónica en todos los casos.

Tabla 1. Hallazgos clínicos de los portadores de mutaciones en *LRSAM1* analizados. Tomado de Peeters et al.¹³.

Caso	Edad (años)	Edad al inicio (década)	Debilidad distal de los MMII	Arreflexia		RP	RA	Alteraciones sensoriales		Pie cavo	CMTNS
				MMSS	MMII			MMSS	MMII		
II-1	84*	5	+	-	-	-	+	-	+	+	6**
II-2	85*	2	+	-	-	+	+	-	+	+	9**
III-1	58*	2	+	+	+	+	+	+	+	+	11**
III-8	64	2	+	-	-	-	+	+	+	+	7
III-10	59	2	+	+	+	+	+	+	+	+	9
IV-1	47	Asint.	-	-	-	-	-	-	-	+	3
IV-2	41	Asint.	-	-	-	-	-	-	-	+	0
IV-4	44	Asint.	-	-	+	+	+	-	+	+	5
IV-10	40	Asint.	-	-	-	-	-	-	-	+	3
IV-11	38	Asint.	-	-	-	-	+	-	+	+	3
IV-12	35	Asint.	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Asint.: asintomático; CMTNS: Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score; MMII: miembros inferiores; MMSS: miembros superiores; RA: reflejo aquileo; RP: reflejo patelar. *: edad de fallecimiento; **: puntuación CMTNS estimada de forma retrospectiva 1; +: presencia de alteraciones; -: ausencia de alteraciones.



Figura 8. Hallazgos clínicos actualizados. Serie de imágenes del caso IV-4 (A-D) y del caso IV-11 (E-I) a la edad de 32 años (numeración correspondiente al árbol genealógico de la figura 7). A) A los 25 años de edad, las extremidades inferiores del paciente IV-4 parecen normales. Nótese la ausencia de atrofia muscular peroneal y de dedos en garra. B) Detalle de las plantas de los pies, que muestran una marcada oquedad en la zona central y callosidades a lo largo del arco anterior y del borde externo. C) A los 43 años, el paciente IV-4 presenta amiotrofia de la parte inferior de las piernas, principalmente en los músculos peroneos. A pesar de ello, no se objetivó debilidad de los músculos dorsiflexores y eversores del pie ni dificultad para la marcha de talones. D) Un primer plano del pie izquierdo muestra atrofia del extensor corto de los dedos (flechas). E-G) No se objetivan signos de amiotrofia en la parte inferior de las piernas de la paciente IV-11; se puede observar pie cavo y dedos en garra incluso en bipedestación (E, G). H-I) Primer plano de los pies, con marcado pie cavo varo y dedos en garra. Tomado de Peeters et al.¹³.

Tabla 2. Rasgos electrofisiológicos (la numeración de los pacientes se corresponde con la de la figura 7). Tomado de Peeters et al.¹³.

	III-8	III-10	IV-1	IV-2	IV-4	IV-10	IV-11	IV-12	Rango de normalidad
Nervio mediano									
LMD (ms)	4,0	3,8	3,1	3,4	2,9	4,6	3,6	2,5	≤ 4,4
VCM (m/s)	56,2	49,0	58,6	55,4	59,1	52,9	53,0	62,5	≥ 49,0
PAMC (mV)	6,3	5,6	9,7	4,7	6,9	4,8	7,6	10,1	≥ 4,0
Onda F (ms)	30,4	33,2	28,0	25,7	24,3	30,6	30,8	25,3	≤ 31,0
VCS (m/s)	48,5	42,3	50,0	48,4	50,8	37,9	52,0	57,1	≥ 45,0
PANS (µV)	1,9	2,1	2,4	9,8	3,9	0,37	2,9	8,4	≥ 7,0
Nervio cubital									
LMD (ms)	NE	2,6	2,4	NE	2,4	2,9	2,4	2,1	≤ 3,3
VCM (m/s)	NE	42,3	53,8	NE	61,7	54,3	57,1	63,9	≥ 49,0
PAMC (mV)	NE	3,7	7,0	NE	7,8	11,0	10,9	7,7	≥ 6,0
Onda F (ms)	NE	36,1	32,4	NE	26,5	27,6	29,1	26,0	≤ 32,0
VCS (m/s)	NE	48,1	53,2	NE	53,1	47,7	56,0	54,2	≥ 47,0
PANS (µV)	NE	0,5	3,0	NE	1,6	3,9	5,5	3,0	≥ 3,0
Nervio peroneo									
LMD (ms)	6,2	5,1	5,5	5,6	5,5	5,6	4,2	3,9	≤ 5,5
VCM (m/s)	39,9	33,5	46,4	51,2	41,1	46,1	44,3	51,9	≥ 44,0
PAMC EDB (mV)	4,7	0,7	3,3	2,6	1,8	1,3	3,0	6,6	≥ 2,0
PAMC TA (mV)	NE	3,3	7,3	NE	7,6	5,1	6,2	5,4	≥ 5,0
Onda F (ms)	55,4	A	53,8	49	A	51,7	48	46,7	≤ 56,0
Nervio tibial									
LMD (ms)	5,9	A	5,8	5,1	4,8	4,0	6,1	NE	≤ 5,8
VCM (m/s)	43,0	A	43,7	48,1	36,3	49,2	41,1	NE	≥ 41,0
PAMC (mV)	2,9	A	5,5	12,5	4,4	9,1	4,8	NE	≥ 4,0
Onda F (ms)	57,6	A	52,6	NE	53,5	51,4	57,4	NE	≤ 56,0
Nervio sural									
VCS (m/s)	47,3	A	49,1	36	44,8	52,9	46,7	53,1	≥ 40,0
PANS (µV)	4,1	A	6,3	0,6	7	2,9	1,3	8,1	≥ 6,0

A: ausente; EDB: extensor digitorum brevis; LMD: latencia motora distal; NE: no estudiado; PAMC: potenciales de acción muscular compuestos; PANS: potenciales de acción nerviosos sensitivos; TA: músculo tibial anterior; VCM: velocidad de conducción motora; VCS: velocidad de conducción sensitiva. Los valores anormales se marcan con negrita.

Hallazgos de resonancia magnética

Se realizó RM de los músculos de las piernas en ocho individuos: dos pacientes sintomáticos (III-8 y III-10) y seis individuos con riesgo (IV-1, IV-4, IV-8, IV-10, IV-11 y IV-12) (según numeración de la figura 7A)¹¹⁻¹³. Los músculos de la parte inferior de la pierna y del pie estaban preservados únicamente en el caso IV-8 (figura 9A-C¹³), que no portaba la mutación causal (ver más adelante). Sin embargo, los siete restantes (todos portadores de la mutación) presentaban alteraciones en la RM, que fueron haciéndose más evidentes a medida que progresaba la enfermedad (figura 9D-I¹³). Los músculos de la pantorrilla mostraban atrofia grasa de forma bilateral, leve o moderada y predominantemente distal, y principalmente a nivel superficial del compartimento posterior. El hallazgo de edema a nivel de los músculos de la pantorrilla fue excepcional. No se observó realce tras la administración de contraste en los casos estudiados (III-8 y III-10). En comparación con los músculos de la parte baja de la pierna, los músculos intrínsecos del pie mostraban una atrofia grasa más avanzada en todos los casos (figura 9F-I¹³).

Hallazgos genéticos: estudios de ligamiento

Estudiamos otros miembros de la familia (casos IV-1, IV-5, IV-10, IV-12 y IV-13; figura 7A¹¹⁻¹³) y reconsideramos la afectación en siete individuos (ver más arriba). Debido a que el fenotipo de la cuarta generación es muy leve, la afectación de cuatro individuos asintomáticos (IV-5, IV-8, IV-9 y IV-12) se consideró “desconocida”. Un nuevo análisis de ligamiento de genoma completo demostró que la región CMT2G del cromosoma 12q12-q13.3 ya no estaba ligada al fenotipo de la enfermedad¹²; sin embargo, se identificó una nueva región de ligamiento concluyente en el cromosoma 13q31.3-q34.2 ($Z_{\text{máx}} = 3,186$ para $\theta = 0$; figura 7B¹¹⁻¹³). Un análisis del genotipo confirmó un haplotipo común en todos los individuos afectados (figura 7B¹¹⁻¹³). Eventos recombinantes clave (en los casos II-1, IV-4, IV-10, IV-11 y IV-12) localizaron el haplotipo en una región de 23,6 Mb entre los marcadores D9S2026 y D9S164.

Hallazgos genéticos: análisis de mutaciones

Volvimos a estudiar los resultados del análisis WGS para encontrar variantes codificantes nuevas en el locus del cromosoma 9 que estuviesen presentes en los individuos afectados (IV-2 y IV-11; figura 7A¹¹⁻¹³) y ausentes en

el individuo no afecto (IV-9)¹³. Tras el filtrado de datos no obtuvimos ninguna variante que cumpliera dichas características, por lo que, para descartar falsos negativos, realizamos un análisis WES de los datos de tres individuos afectados (II-2, III-1 y IV-11). Dicho análisis detectó en los tres una nueva mutación de cambio de sentido (c.2081G>A, p.Cys694Tyr; figura 7C¹¹⁻¹³) en *LRSAM1*. Este gen ya se había asociado a CMT2P²⁹⁻³². El análisis WGS de los dos individuos afectados no cubría esta posición genómica concreta. La variante de *LRSAM1* estaba presente en todos los portadores del haplotipo de la enfermedad, y ausente en los 164 controles españoles. Afecta a un nucleótido conservado (puntuación de 5,26 en Genomic Evolutionary Rate Profiling) y a un residuo de aminoácido (puntuación de 0,998 en PolyPhen-2) en el dominio de dedo de zinc tipo RING de la proteína *LRSAM1*.

Estudios de proteínas

Las variantes patogénicas de *LRSAM1* reportadas afectan a la longitud³⁰⁻³² o abundancia²⁹ de la proteína. Por ello, comparamos los niveles de proteína *LRSAM1* en los linfoblastos de cinco portadores y cuatro no portadores de la mutación, sin observar diferencias en la expresión de la proteína entre ambos grupos (figura 10A)¹³. Además, una mutación en *LRSAM1* que afecta al dominio RING altera su actividad de ubiquitina ligasa, produciendo un aumento de su diana de ubiquitinación TSG101^{30,33}. Probamos el efecto potencial de la proteína mutada sobre TSG101, pero la expresión detectada en pacientes y controles fue similar (figura 10A¹³).

Análisis del transcriptoma

El análisis de expresión diferencial del transcriptoma de los linfoblastos de tres portadores de la mutación en *LRSAM1* (III-10, IV-10 y IV-11; figura 7¹¹⁻¹³) y de tres individuos no portadores de la mutación (III-9, IV-5 y IV-8) mostró varios transcritos desregulados (figura 10B¹³; Material Suplementario tabla S1)¹³. Mediante PCR con transcripción inversa cuantitativa, validamos 35 genes codificantes de proteínas que mostraban un cambio de expresión significativo ($\log_2 \text{fold-change} \geq 0,5$, tanto con el algoritmo DESeq2 como con el algoritmo edgeR, y ≥ 100 conteos brutos de lecturas en todas las muestras de al menos un grupo; ver Material Suplementario tabla S1¹³). Para ampliar la relevancia de nuestros hallazgos, añadimos muestras de otros dos portadores de la mutación (III-8 y IV-12) y de un individuo no portador

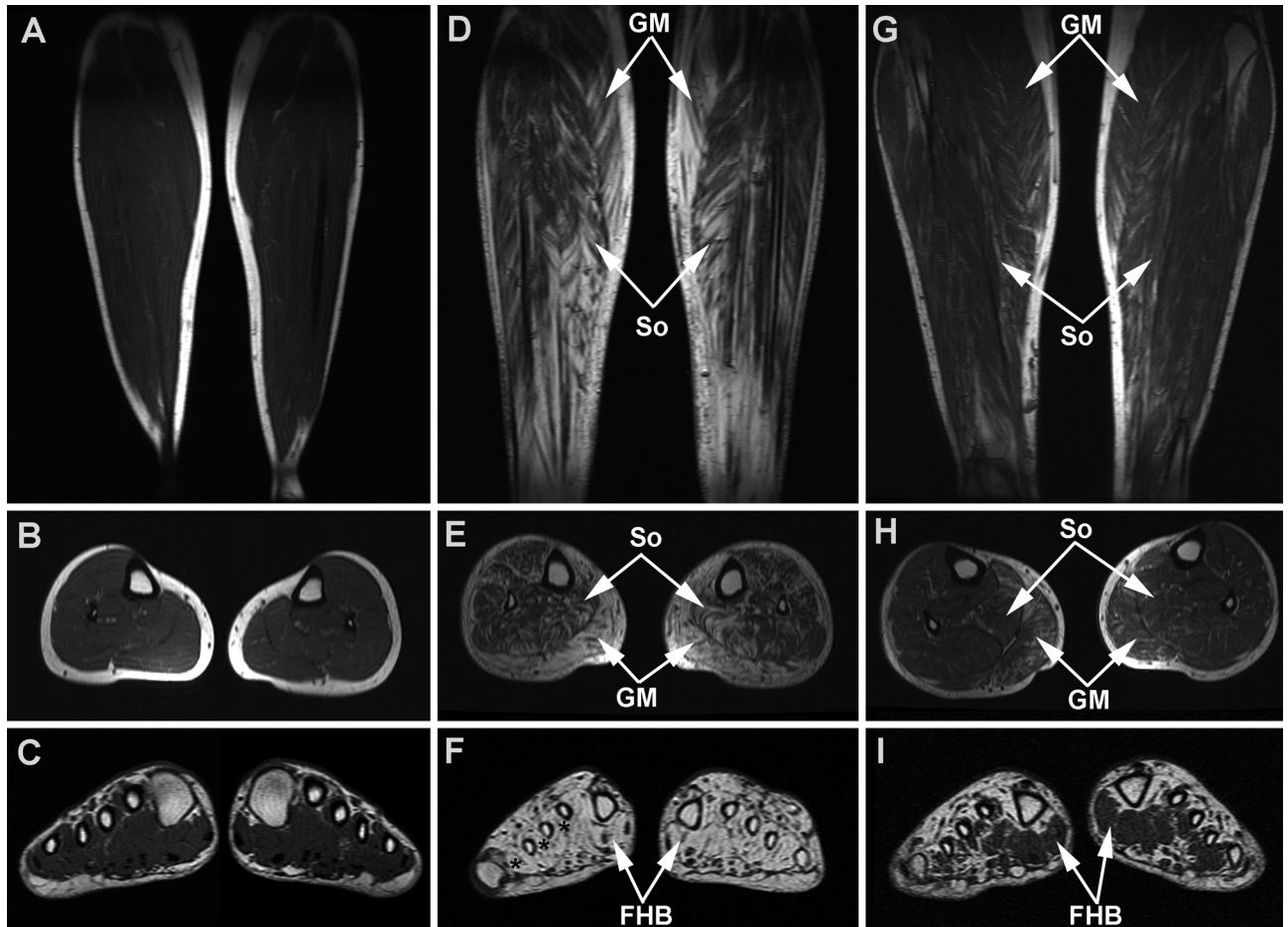


Figura 9. Estudio de RM de los músculos de la parte inferior de las piernas. Secuencias ponderadas en T1: plano coronal del aspecto posterior de las pantorrillas (fila superior), plano axial a la altura de la mitad de las pantorrillas (fila central) y plano axial de los pies a nivel de los metatarsianos (fila inferior). A-C) Caso IV-8 (ver figura 7), a la edad de 38 años, con hallazgos normales en la exploración física y sin mutaciones en *LRSAMI*: obsérvese que los músculos de las pantorrillas y los pies están preservados. D-F) Caso III-10 (ver figura 7): se observa infiltración grasa predominantemente distal en los cuatro compartimentos musculares, que afecta principalmente al sóleo (So) y gemelo interno (GM). Nótese la marcada atrofia grasa de los músculos intrínsecos del pie, especialmente los músculos interóseos del pie derecho (asteriscos) y el flexor hallucis brevis (FHB) de ambos pies. G-I) En el caso IV-1, se observa infiltración grasa leve y predominantemente distal en el sóleo (So) y el gemelo interno (GM). La atrofia de los músculos intrínsecos del pie es más marcada, particularmente en el flexor hallucis brevis (FHB). Tomado de Peeters et al.¹³.

(IV-9). Identificamos seis transcritos sobrerregulados y dos transcritos infrarregulados en los linfoblastos de los pacientes (figura 10C¹³), entre los que se encontraban los de *NEDD4L*, que codifica otra ligasa E3 de ubiquitina, y *TNFRSF21*, un regulador clave de la degeneración axonal.

Discusión

Este artículo describe un estudio longitudinal llevado a cabo a lo largo de cuatro décadas en una gran familia con CMT2. En las evaluaciones iniciales, realizadas entre 1977 y 1985, se identificaron 10 pacientes de ambos sexos pertenecientes a tres generaciones diferentes con transmisión varón a varón, que indica un patrón de herencia autosómico dominante¹¹. La enfermedad se manifiesta con un fenotipo de neuropatía leve a moderada caracterizado por pie cavo, ligera hipoestesia en calcetín y amiotrofia peroneal con escasa progresión clínica. Solo se observó amiotrofia peroneal asimétrica, según la descripción de Tooth¹⁴, en nuestro paciente índice (figura 3^{11,14}); sorprendentemente, hasta un 9,4% de los pacientes con CMT1A mostraron asimetría en la fuerza de los músculos de las piernas³⁴. Siete de los 11 individuos con riesgo de la tercera generación, con edades comprendidas entre los 22 y los 41 años, estaban afectados. Por el contrario, solo uno de los 10 individuos con riesgo de la cuarta generación, con edades entre uno y 15 años, presentaba afectación. Esto sugiere un patrón de penetrancia incompleta en las dos primeras décadas de vida, una característica genética muy poco frecuente en CMT^{30,31,35}.

Nuestro estudio patológico reveló neuronopatía sensitivomotora lumbosacra con degeneración axonal dependiente de la longitud (fenómeno de degeneración retrógrada o *dying back*)¹¹. Este es un estudio patológico sin precedentes, ya que combina el examen de la médula espinal con un análisis morfológico y morfométrico de las raíces ventrales y dorsales a nivel de L5 y de los nervios de las extremidades inferiores (peroneo y tibial posterior), comparando los resultados de segmentos proximales y distales de los nervios. El estudio de anatomía patológica también analizó el nervio sural en dos casos, con hallazgos similares a los obtenidos en otros nervios de las extremidades inferiores.

En 1983, el equipo de investigación de uno de los autores (JB) reportó cuatro grandes familias con CMT1¹⁵, y poco después el actual árbol genealógico de CMT2¹¹. Esto llamó la atención de la Dra. Anita Harding, del National

Hospital for Neurology and Neurosurgery en Londres, que por aquel entonces estaba interesada en el mapeo de posibles variantes patogénicas, mediante estudios de ligamiento, en familias con tres o más individuos afectados y el mayor número posible de individuos no afectados con riesgo. Este fue el inicio de una fructífera colaboración, a tenor de la cual se enviaron datos clínicos y muestras de sangre a la Dra. Harding para la extracción de ADN, lo que permitió confirmar el ligamiento de CMT1A con la región pericentromérica del cromosoma 17¹⁷, y que la duplicación de ADN en 17p11.2 era la causa de la enfermedad, como se comentaba anteriormente¹⁸. Cabe destacar que inicialmente se había reportado que, en dos de las ocho familias con CMT1A asociada a duplicaciones, la enfermedad presentaba una asociación con el locus del grupo sanguíneo del sistema Duffy, localizado en el cromosoma 1³⁶. Sin embargo, la familia AC no disponía de diagnóstico molecular. Además, ninguno de los pacientes de esta estirpe presentaba signos característicos de CMT1A, como engrosamiento de los nervios o enlentecimiento de la conducción nerviosa en rango desmielinizante.

Quiso el destino que los datos clínicos y muestras de ADN de la familia AC se trasladaran del Mothercare Department of Paediatric Genetics, en Londres, al departamento de genética molecular de la Universidad de Amberes en 1996. Tras su contacto científico durante la séptima reunión de la European Neurological Society (Rodas, 1997), la Dra. Christine Van Broeckhoven y el Dr. José Berciano (JB) decidieron llevar a cabo un análisis de ligamiento en esta gran familia, lo que implicaba la reevaluación de 10 individuos con riesgo pertenecientes a la cuarta generación, dado que solo uno de ellos había sido catalogado como afecto tras el estudio inicial¹¹.

Los datos clínicos y genéticos actualizados nos permitieron por fin establecer la causa genética de CMT2G. La única familia de esta categoría es portadora de la primera mutación de cambio de sentido en *LRSAM1*, y por tanto debería ser reclasificada como CMT2P.

Las mutaciones en *LRSAM1* causan CMT2P autosómica dominante^{13,30-32,37-44} o recesiva^{29,43} (para una revisión sobre el tema, véase Palaima et al.⁴⁵). Las mutaciones dominantes descritas hasta la fecha se asocian con neuronopatía axonal sensitivomotora relativamente leve y de curso muy lento, que afecta de forma predominante o exclusiva a las extremidades inferiores. En muy raras ocasiones, el cuadro clínico se caracteriza por ataxia sensitiva⁴¹. La

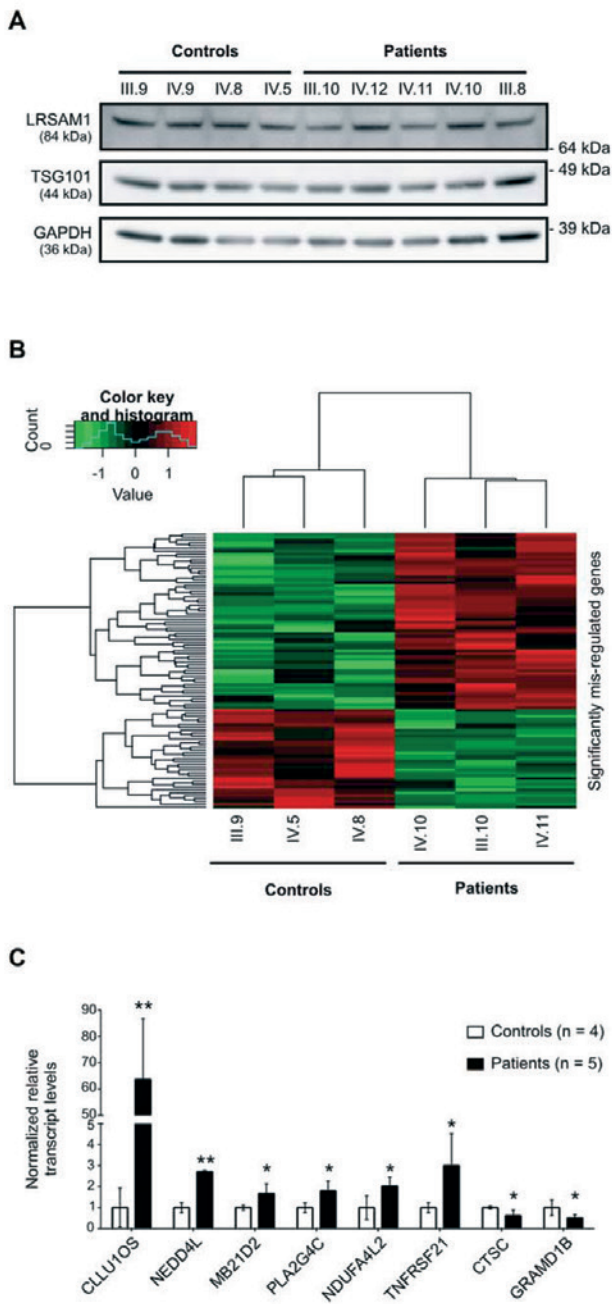


Figura 10. Análisis de proteínas y del transcriptoma. A) Análisis de Western blot de LRSAM1 y TSG101 en lisados de linfoblastos de cinco pacientes y cuatro controles. Se usó la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. B) Mapa de calor generado a partir de datos de secuenciación del transcriptoma, que refleja el nivel de expresión de los genes con desregulación significativa identificados mediante el algoritmo DESeq2 (expresado como recuentos normalizados y transformados a escala logarítmica) en muestras de pacientes y controles. C) La PCR cuantitativa en tiempo real muestra niveles de expresión relativa (normalizados frente a GAPDH, proteína de unión a TATA y subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa) de ocho transcritos desregulados significativamente en linfoblastos, obtenidos de cinco pacientes y comparados con cuatro controles. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Tomado de Peeters et al.¹³.

enfermedad suele aparecer entre la segunda y la cuarta década de la vida, pero, tal como se describe en este artículo y en una familia con una mutación dominante en el sitio de empalme en *LRSAM1*, algunos pacientes son asintomáticos³¹. Además, tres pacientes de avanzada edad portadores de una mutación con cambio de marco en *LRSAM1* desarrollaron enfermedad de Parkinson, lo que sugiere que dicho gen podría desempeñar un papel en la degeneración de la sustancia negra⁴⁶.

Nuestro estudio amplió el conocimiento existente sobre el espectro genético y fenotípico de *LRSAM1*¹³. En general, en raras ocasiones se observa penetrancia incompleta en subtipos de CMT³⁵, y sin embargo parece ser un fenómeno común en el contexto de las neuropatías relacionadas con *LRSAM1*, como demuestra la evidencia acumulada hasta el momento³¹. El hecho de que algunos portadores de mutaciones solo presenten pie cavo y hallazgos electrofisiológicos mínimos merece un estudio detallado. Como remarcó Michael Shy⁴⁷ en un comentario, “el diagnóstico genético aún depende de un examen clínico detallado, a pesar de las técnicas modernas de análisis de ADN”. Además, aunque el pie cavo fue una constante entre nuestros pacientes, cabe mencionar que encontramos pie cavo aislado en individuos con riesgo que finalmente resultaron ser individuos no afectados; estos casos deberían clasificarse retrospectivamente como pie cavo idiopático²⁶. En otras palabras, “hallazgos como el de pie cavo, que se creía que eran indicadores de un diagnóstico de CMT, han resultado no serlo”⁴⁷.

Nuestros hallazgos resaltaron la importancia de la RM para detectar y describir patologías del músculo esquelético¹³. En línea con observaciones previas de CMT1A y CMT2A^{27,48,49}, el estudio de RM actual mostró moderada a marcada atrofia grasa de los músculos de los pies en los siete portadores de la mutación subclínica en *LRSAM1*. La infiltración grasa en los músculos de las piernas era menos marcada, y aumentaba distalmente a lo largo del eje longitudinal del vientre muscular. Como ocurre con otros fenotipos dominantes de CMT axonal, la atrofia grasa era más marcada en los músculos del compartimento posterior superficial⁴⁹. La infiltración grasa observada principalmente en los músculos del pie y el gradiente proximal a distal de los músculos de la pantorrilla se correlacionaron con el fenómeno de *dying back* encontrado en nuestro estudio histológico previo del nervio ciático y sus ramas. Cabe señalar que el estudio de RM de un individuo no portador de la mutación mostró una apariencia normal de los músculos de la pantorrilla

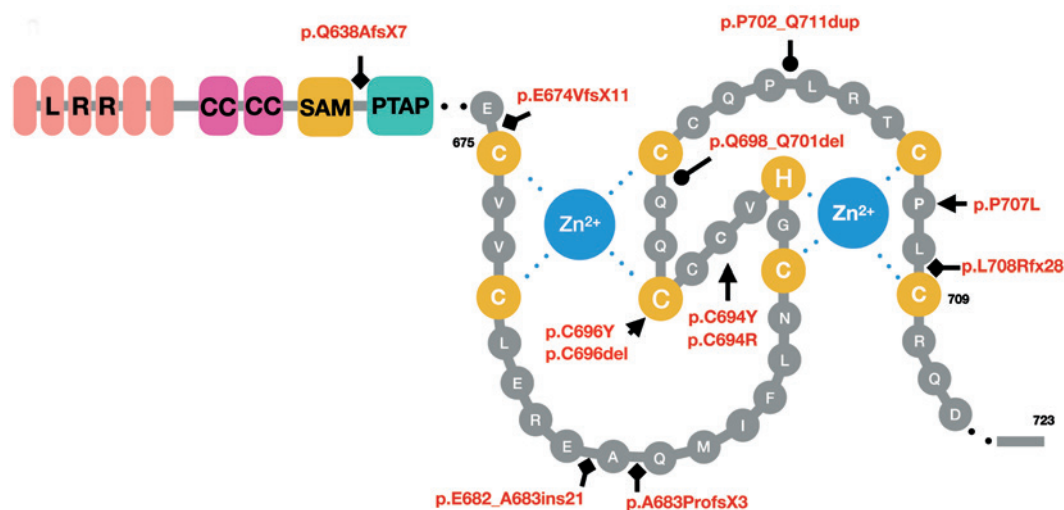


Figura 11. Dominios y localización de las mutaciones en *LRSAM1* que causan enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. LRR: repetición rica en leucina; CC: hélice superenrollada; SAM: motivo estéril alfa; PTAP: motivo Pro-Thr-Ala-Pro; RING: *really interesting new gene* (vista ampliada). Las mutaciones con cambio de marco se indican con cuadrados negros, las mutaciones de cambio de sentido con flechas negras y los cambios dentro del marco de lectura con círculos negros. Los residuos críticos necesarios para la unión de iones de zinc (azul) se muestran en amarillo. Tomado de Palaima et al.⁴⁵.

y el pie. Nuestros hallazgos revelaron que los pacientes con síntomas muy leves presentan alteraciones de los músculos de las piernas detectables por RM, lo que sugiere que la RM muscular podría ser de utilidad para el diagnóstico de neuropatías relacionadas con *LRSAM1*.

Nuestro artículo señaló varios posibles problemas de los estudios genéticos¹³. En primer lugar, un estudio detallado de un locus establecido (el cromosoma 12 para CMT2G) con tecnologías ómicas punteras no logró identificar la mutación causal. La identificación del gen se logró finalmente gracias al seguimiento longitudinal, la reevaluación de la afectación y nuevos análisis de ligamiento. En segundo lugar, el análisis WGS no cubría la posición de la variante c.2081G de *LRSAM1* en los dos pacientes estudiados; la mutación se identificó posteriormente mediante secuenciación ortogonal (WES). La relativamente alta tasa cruda de error de llamado de bases y la variabilidad del desempeño de las plataformas NGS son problemas bien conocidos de esta tecnología⁵⁰. Nuestro estudio destaca el valor añadido de una aproximación que combine dos plataformas, usando protocolos de NGS complementarios⁵¹ para mejorar la detección de variantes y reducir los falsos negativos.

LRSAM1 es una ligasa E3 de ubiquitina de tipo RING multidominio responsable de la ubiquitinación de proteínas objetivo a través de su dominio catalítico C-terminal^{13,45}. La figura 11 ilustra los dominios de *LRSAM1* y la localización de mutaciones patogénicas.⁴⁵ *LRSAM1* tiene varias funciones celulares ya que modula la agregación de proteínas, la maquinaria de clasificación endosomal y la salida viral de la célula, lo que la hace interesante en el estudio no solo de las alteraciones de la formación de proteínas como la neurodegeneración, sino también de enfermedades inmunológicas y oncológicas⁵². El único objetivo de ubiquitinación conocido de *LRSAM1* es la proteína TSG101, que participa en la clasificación lisosomal de la carga ubiquitinada³³. La inactivación del homólogo de *LRSAM1* en peces cebra produce un desarrollo anormal de las neuronas motoras³⁰, mientras que la inactivación de *Lrsam1* en ratones sensibiliza los axones de las neuronas periféricas a otras mutaciones o tóxicos ambientales⁵³. Cabe resaltar que estos datos experimentales presentan una buena correlación con nuestros hallazgos histológicos, lo que demuestra que la base patológica de CMT2P es una neuropatía sensitivomotora con degeneración axonal dependiente de la longitud.

Las mutaciones en *LRSAM1* reportadas hasta la fecha en que se descubrió la mutación en la familia AC (figura 11⁴⁵) truncan, alteran o suprimen el dominio catalítico de dedo de zinc tipo RING de la proteína *LRSAM1*^{13,29-32,45}. Nuestro grupo de estudio reportó la primera mutación causal en *LRSAM1*, que también involucra al dominio de dedo de zinc tipo RING¹³. Las mutaciones de cambio de sentido sintéticas en este dominio anulan la función de ubiquitinación³³. Del mismo modo, se ha encontrado una inserción causante de CMT2P en *LRSAM1* que provoca un aumento de los niveles de TSG101 en un modelo celular de sobreexpresión, lo que sugiere que no está ubiquitinada ni degradada³⁰. Estudiamos si la mutación p.Cys694Tyr en *LRSAM1* tenía un efecto similar en los linfoblastos de los pacientes. Esto significa que o bien la mutación no suprime la función de ubiquitinación de *LRSAM1* o bien que la pérdida de dicha función se compensa con mecanismos celulares alternativos. Se ha sugerido que otras ligasas de ubiquitina también pueden dirigirse a cantidades excesivas de TSG101 para provocar degradación proteasomal, evitando así los efectos nocivos de la sobreexpresión de TSG101, como la clasificación endosomal del crecimiento celular^{54,55}. Curiosamente, nuestro análisis del transcriptoma parece apoyar esta hipótesis. Los resultados obtenidos con las células de los pacientes mostraron un aumento de la transcripción de *NEDD4L*, un gen que codifica otra ligasa E3 de ubiquitina dirigida a TSG101¹³. Por tanto, *NEDD4L* podría compensar la pérdida de función de *LRSAM1*, lo que podría explicar la presencia de un fenotipo leve en pacientes con mutaciones en *LRSAM1*¹³.

Además, los portadores de la mutación p.Cys694Tyr presentan un aumento de la transcripción de *TNFRSF21*, un regulador clave de la degeneración axonal⁵⁶. Del mismo modo, los niveles de *TNFRSF21* están elevados en la médula espinal de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA)⁵⁷ y en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer⁵⁸, lo que promueve muerte neuronal a través de la activación de vías de señalización de caspasas. El bloqueo de la función de *TNFRSF21* con un anticuerpo antagonista provoca un aumento de la supervivencia de las neuronas motoras y una mejora de la función motora en ratones con ELA⁵⁷, además de proporcionar protección contra la neurotoxicidad inducida por A β 42 en cultivos de neuronas neocorticales. Sería interesante estudiar si esta prometedora aproximación terapéutica podría provocar efectos neuroprotectores similares en modelos de CMT2P y, en último término, en pacientes

con la enfermedad. En resumen, nuestro análisis del transcriptoma de pacientes con CMT2P abre nuevas perspectivas sobre las vías celulares asociadas con la disfunción de *LRSAM1* y proporciona nuevas dianas para futuros estudios.

Conclusiones

La identificación de la mutación patogénica en una gran familia con CMT2 de herencia autosómica dominante y penetrancia incompleta estuvo precedida de cuatro décadas de estudio clínico, electrofisiológico, histopatológico y de imagen ininterrumpido de los músculos de los pies y las piernas en estos pacientes para poder llegar a una definición fiable del fenotipo clínico. En 2004, un primer análisis de ligamiento llevó a localizar erróneamente al gen responsable en el cromosoma 12q (CMT2G). Una identificación más precisa de pacientes con la enfermedad entre todos los individuos con riesgo nos permitió redefinir la región ligada con la enfermedad en el cromosoma 9q y, posteriormente, identificar una nueva mutación de cambio de sentido en el gen *LRSAM1* (p.Cys694Tyr). Estos resultados son consecuencia de la extraordinaria y duradera colaboración entre clínicos españoles y genetistas belgas.

Agradecimientos

Deseamos expresar nuestra más sincera gratitud a nuestros compañeros en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, la Universidad de Cantabria, la Universidad de Amberes y el VIB por su inestimable ayuda en los ámbitos de la clínica, la neurofisiología, la anatomía patológica, la imagen y la genética a lo largo de cuatro décadas de trabajo ininterrumpido con la familia AC, a cuyos miembros también deseamos trasladar nuestro agradecimiento por su siempre presta colaboración. También damos las gracias al Dr. José Gazulla por su revisión estilística del manuscrito en inglés. Por último, quisiéramos rendir tributo a la Profesora Anita Harding, que en paz descansa, quien inició generosamente la investigación objeto del presente artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de interés. Este estudio no ha recibido financiación pública ni privada.

Bibliografía

- Combarros O, Calleja J, Polo JM, Berciano J. Prevalence of hereditary motor and sensory neuropathy in Cantabria. *Acta Neurol Scand.* 1987;75:9-12.
- Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain.* 1980;103:259-80.
- Harding AE, Thomas PK. Genetic aspects of hereditary motor and sensory neuropathy (types I and II). *J Med Genet.* 1980;17:329-36.
- Harding AE, Thomas PK. Autosomal recessive forms of hereditary motor and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1980;43:669-78.
- Dyck PJ. Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory and autonomic neurons. En: Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R, eds. *Peripheral neuropathy.* Filadelfia y Londres: Saunders; 1984. p.1600-55.
- Madrid R, Bradley WG, Davis CJ. The peroneal muscular atrophy syndrome. Clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. Part 2. Observations on pathological changes in sural nerve biopsies. *J Neurol Sci.* 1977;32:91-122.
- Berciano J, García A, Gallardo E, Peeters K, Pelayo-Negro AL, Álvarez-Paradelo S, et al. Intermediate Charcot-Marie-Tooth disease: an electrophysiological reappraisal and systematic review. *J Neurol.* 2017;264:1655-77.
- Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol.* 2013;9:562-71.
- Pipis M, Rossor AM, Laura M, Reilly MM. Next-generation sequencing in Charcot-Marie-Tooth disease: opportunities and challenges. *Nat Rev Neurol.* 2019;15:644-56.
- Parmar JM, Laing NG, Kennerson ML, Ravenscroft G. Genetics of inherited peripheral neuropathies and the next frontier: looking backwards to progress forwards. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2024;95:992-100.
- Berciano J, Combarros O, Figols J, Calleja J, Cabello A, Silos I, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy type II. Clinicopathological study of a family. *Brain.* 1986;109:897-91.
- Nelis E, Berciano J, Verpoorten N, Coen K, Dierick I, Van Gerwen V, et al. Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12-q13.3. *J Med Genet.* 2004;41:193-7.
- Peeters K, Palaima P, Pelayo-Negro AL, García A, Gallardo E, García-Barredo R, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2G redefined by a novel mutation in LRSAM1. *Ann Neurol.* 2016;80:823-33.
- Tooth HH. The peroneal type of progressive muscular atrophy. Londres: HK Lewis; 1886.
- Combarros O, Calleja J, Figols J, Cabello A, Berciano J. Dominantly inherited motor and sensory neuropathy type I. Genetic, clinical, electrophysiological and pathological features in four families. *J Neurol Sci.* 1983;61:181-91.
- Middleton-Price HR, Harding AE, Berciano J, Pastor JM, Huson SM, Malcolm S. Absence of linkage of hereditary motor and sensory neuropathy type I to chromosome 1 markers. *Genomics.* 1989;4:192-7.
- Middleton-Price HR, Harding AE, Monteiro C, Berciano J, Malcolm S. Linkage of hereditary motor and sensory neuropathy type I to the pericentromeric region of chromosome 17. *Am J Hum Genet.* 1990;46:92-4.
- Hallam PJ, Harding AE, Berciano J, Barker DF, Malcolm S. Duplication of part of chromosome 17 is commonly associated with hereditary motor and sensory neuropathy type I (Charcot-Marie-Tooth disease type 1). *Ann Neurol.* 1992;31:570-2.
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, et al. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord.* 1991;1:93-7.
- Shy ME, Blake J, Krajewski K, Fuerst DR, Laura M, Hahn AF, et al. Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability. *Neurology.* 2005;64:1209-14.
- Shy ME, Chen L, Swan ER, Taube R, Krajewski KM, Herrmann D, et al. Neuropathy progression in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Neurology.* 2008;70:378-83.
- Berciano J, Combarros O, Calleja J, Polo JM, Leno C. The application of nerve conduction and clinical studies to genetic counseling in hereditary motor and sensory neuropathy type I. *Muscle Nerve.* 1989;12:302-6.
- García A, Combarros O, Calleja J, Berciano J. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p duplication in infancy and early childhood: a longitudinal clinical and electrophysiologic study. *Neurology.* 1998;50:1061-7.
- Berciano J, García A, Combarros O. Initial semeiology in children with Charcot-Marie-Tooth disease 1A duplication. *Muscle Nerve.* 2003;27:34-9.
- Berciano J, Gallardo E, García A, Pelayo-Negro AL, Infante J, Combarros O. New insights into the pathophysiology of pes cavus in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *J Neurol.* 2011;258:1594-602.
- Karakis I, Gregas M, Darras BT, Kang PB, Jones HR. Clinical correlates of Charcot-Marie-Tooth disease in patients with pes cavus deformities. *Muscle Nerve.* 2013;47:488-92.
- Gallardo E, García A, Combarros O, Berciano J. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication: spectrum of clinical and magnetic resonance imaging features in leg and foot muscles. *Brain.* 2006;129:426-37.
- Rossor AM, Tomaselli PJ, Reilly MM. Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2016;29:537-48.
- Guernsey DL, Jiang H, Bedard K, Evans SC, Ferguson M, Matsuoka M, et al. Mutation in the gene encoding ubiquitin ligase LRSAM1 in patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *PLoS Genet.* 2010;6:e1001081.
- Weterman MA, Sorrentino V, Kasher PR, Jakobs ME, van Engelen BG, Fluiter K, et al. A frameshift mutation in LRSAM1 is responsible for a dominant hereditary polyneuropathy. *Hum Mol Genet.* 2012;21:358-70.
- Nicolaou P, Cianchetti C, Minaidou A, Marrosu G, Zamba-Papanicolaou E, Middleton L, et al. A novel LRSAM1 mutation

- is associated with autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:190-4.
32. Engholm M, Sekler J, Schöndorf DC, Arora V, Schittenhelm J, Biskup S, et al. A novel mutation in LRSAM1 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease with dominant inheritance. *BMC Neurol.* 2014;14:118.
 33. Amit I, Yakir L, Katz M, Zwang Y, Marmor MD, Citri A, et al. Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes Dev.* 2004;18:1737-52.
 34. Pelayo-Negro AL, Carr AS, Laura M, Skorupinska M, Reilly MM. An observational study of asymmetry in CMT1A. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86:589-90.
 35. Berciano J, Baets J, Gallardo E, Zimoń M, García A, López-Laso E, et al. Reduced penetrance in hereditary motor neuropathy caused by TRPV4 Arg269Cys mutation. *J Neurol.* 2011;258:1413-21.
 36. Guiloff RJ, Thomas PK, Contreras M, Armitage S, Schwarz G, Sedgwick EM. Linkage of autosomal dominant type I hereditary motor and sensory neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1982;45:669-74.
 37. Hu B, Arpag S, Zuchner S, Li J. A novel missense mutation of CMT2P alters transcription machinery. *Ann Neurol.* 2016;80:834-45.
 38. Peddareddygar LR, Oberoi K, Vellore JR, Grewal RP. Factors affecting phenotype variability in a family with CMT2B: gender and LRSAM1 genotype. *Case Rep Neurol.* 2016;8:120-6.
 39. Hakonen JE, Sorrentino V, Avagliano Trezza R, de Wissel MB, van den Berg M, Bleijlevens B, et al. LRSAM1-mediated ubiquitylation is disrupted in axonal Charcot-Marie-Tooth disease 2P. *Hum Mol Genet.* 2017;26:2034-41.
 40. Zhao G, Song J, Yang M, Song X, Liu X. A novel mutation of LRSAM1 in a Chinese family with Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst.* 2018;23:55-9.
 41. Peretti A, Perie M, Vincent D, Bouhour F, Dieterich K, Mallaret M, et al. LRSAM1 variants and founder effect in French families with ataxic form of Charcot-Marie-Tooth type 2. *Eur J Hum Genet.* 2019;27:1406-18.
 42. Mortreux J, Bacquet J, Boyer A, Alazard E, Bellance R, Giguet-Valard AG, et al. Identification of novel pathogenic copy number variations in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet.* 2020;65:313-23.
 43. Reilich P, Schlotter B, Montagnese F, Jordan B, Stock F, Schäff-Vogelsang M, et al. Location matters - Genotype-phenotype correlation in LRSAM1 mutations associated with rare Charcot-Marie-Tooth neuropathy CMT2P. *Neuromuscul Disord.* 2021;31:123-33.
 44. Milella G, Amati A, Lastella P, Zanfardino P, Petruzzella V, Zoccollella S. A novel mutation in the LRSAM1 gene in a family with early onset autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth type 2P. *Clin Neurol Neurosurg.* 2024;237:108158.
 45. Palaima P, Berciano J, Peeters K, Jordanova A. LRSAM1 and the RING domain: Charcot-Marie-Tooth disease and beyond. *Orphanet J Rare Dis.* 2021;16:74.
 46. Aerts MB, Weterman MA, Quadri M, Schelhaas HJ, Bloem BR, Esselink RA, et al. A LRSAM1 mutation links Charcot-Marie-Tooth type 2 to Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;3:146-9.
 47. Shy M. LRSAM1 lessons. *Ann Neurol.* 2016;80:821-2.
 48. Berciano J, Gallardo E, García A, Infante J, Mateo I, Combarros O. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication with severe paresis of the proximal lower limb muscles: a long-term follow-up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:1169-76.
 49. Chung KW, Suh BC, Shy ME, Cho SY, Yoo JH, et al. Different clinical and magnetic resonance imaging features between Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and 2A. *Neuromuscul Disord.* 2008;18:610-8.
 50. Lelieveld SH, Spielmann M, Mundlos S, Veltman JA, Gilissen C. Comparison of exome and genome sequencing technologies for the complete capture of protein-coding regions. *Hum Mutat.* 2015;36:815-22.
 51. Chennagiri N, White EJ, Frieden A, Lopez E, Lieber DS, Nikiforov A, et al. Orthogonal NGS for high throughput clinical diagnostics. *Sci Rep.* 2016;6:24650.
 52. Mishra R, Upadhyay A, Prajapati VK, Dhiman R, Poluri KM, Jana NR, et al. LRSAM1 E3 ubiquitin ligase: molecular neurobiological perspectives linked with brain diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76:2093-110.
 53. Bogdanik LP, Sleigh JN, Tian C, Samuels ME, Bedard K, Seburn KL, et al. Loss of the E3 ubiquitin ligase LRSAM1 sensitizes peripheral axons to degeneration in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Dis Model Mech.* 2013;6:780-92.
 54. McDonald B, Martin-Serrano J. Regulation of Tsg101 expression by the steadiness box: a role of Tsg101-associated ligase. *Mol Biol Cell.* 2008;19:754-63.
 55. Chung HY, Morita E, von Schwedler U, Müller B, Kräusslich HG, Sundquist WI. NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPX late domains. *J Virol.* 2008;82:4884-97.
 56. Wang Y, Zhao D, Pan B, Song Z, Shah SZA, Yin X, et al. Death receptor 6 and caspase-6 regulate prion peptide-induced axonal degeneration in rat spinal neurons. *J Mol Neurosci.* 2015;56:966-76.
 57. Huang G, Lee X, Bian Y, Shao Z, Sheng G, Pepinsky RB, et al. Death receptor 6 (DR6) antagonist antibody is neuroprotective in the mouse SOD1G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis.* 2013;4:e841.
 58. Hu Y, Lee X, Shao Z, Apicco D, Huang G, Gong BJ, et al. A DR6/p75(NTR) complex is responsible for beta-amyloid-induced cortical neuron death. *Cell Death Dis.* 2013;4:e579.