



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Diagnóstico de condiciones genéticas mediante secuenciación de exomas

Alumno: Leonor Parrilla Orellana

Octubre, 2020

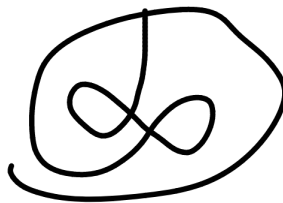


UNIVERSIDAD DE JAÉN FACULTAD DE
CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGÍA

Trabajo Fin de Grado

Diagnóstico de condiciones genéticas mediante secuenciación de exomas



Alumna: Leonor Parrilla Orellana

Jaén. Octubre 2020

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
PALABRAS CLAVE	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. ANTECEDENTES	7
1.1.1. Evolución de los métodos de secuenciación.....	7
2.1.1. Enfermedades raras: situación actual.....	9
3.1.1. Sistema Nervioso Periférico y Charcot-Marie-Tooth	11
2. OBJETIVOS	13
3. NGS COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO	13
4. CHARCOT-MARIE-TOOTH	17
4.1. HISTORIA Y CARACTERÍSTICAS.....	17
4.2. CLASIFICACIÓN Y GENÉTICA.....	20
5. CONCLUSIONES Y VISIÓN DE FUTURO	31
6. BIBLIOGRAFÍA	34

RESUMEN

Los pacientes con enfermedades raras pueden llegar a tener un retraso en el diagnóstico de hasta más de 10 años mediante métodos convencionales, durante los cuales, debido a la falta de este, no se le han administrado los tratamientos y cuidados correspondientes a su patología. Un diagnóstico basado en las nuevas técnicas de secuenciación podría reducir este tiempo de manera considerable, además de facilitar la identificación y el estudio de los posibles genes que se encuentren vinculados a las enfermedades, adicionalmente supondría una reducción significativa en el coste global del diagnóstico. En este trabajo se estudia el impacto de las nuevas técnicas de secuenciación como método de diagnóstico y sus implicaciones a nivel costo-beneficio y, concretamente, sitúa las polineuropatías hereditarias de Charcot-Marie-Tooth como ejemplo de este estudio en la presente revisión.

ABSTRACT

Patients with rare diseases can have a delay of over 10 years in their diagnosis if done by conventional methods – years in which, due to its absence, they haven't been administered the right treatment and care that corresponds to their pathology. A diagnosis based on next-generation sequencing may reduce this delay significantly, aside from facilitating and identification and study of the possible genes that might be linked to related diseases. On this paper, the impact of next-generation sequencing is studied as a method for diagnosis and its implications on a cost-benefit level and, specifically, Charcot-Marie-Tooth's inherited poly-neuro-pathologies as an example of this study on the present review.

PALABRAS CLAVE

Charcot-Marie-Tooth, Next Generation Sequencing, Diagnosis, Rare disease

1. INTRODUCCIÓN

Los seres humanos poseemos un genoma diploide compuesto por 23 pares de cromosomas, formados estos por, aproximadamente, 30 mil millones de pares de bases. El genoma cuenta con cerca de 23.500 genes codificantes para proteínas, y con alrededor de 180.000 exones, que son las secciones codificantes de los genes que llegarán a formar parte de una proteína o un ARN funcional. Al conjunto de exones de un organismo se le denomina su exoma. Además de los exones, los genes están compuestos por secciones que no codifican para una función biológica y que flanquean a los exones, denominadas intrones. Existen, además, unas regiones reguladoras de expresión en los extremos de cada gen (Marian, 2014).

Para conocer la secuencia del genoma, es decir, para conocer el orden de las bases en el código genético, se realiza una secuenciación. Conocer la secuencia del ADN resulta de gran utilidad a la hora de estudiar los distintos genes, exones, regulaciones de expresión genética, para identificar posibles mutaciones de cambios de bases, SNPs (polimorfismos de un único nucleótido, siglas en inglés), deleciones, repeticiones, o traslocaciones, e incluso mutaciones cromosómicas que causan la variabilidad en el genoma y que dependiendo de dónde ocurran, pueden llegar a desencadenar distintas enfermedades (Robert & Pelletier, 2018) (Lodish et al., 2000).

Hay diferentes métodos mediante los cuales se pueden realizar la secuenciación. Los primeros inicios de la secuenciación como técnica y método se produjeron con la técnica de Sanger, desarrollada en 1977, y con el método Maxam-Gilbert, en 1980. La secuenciación Maxam y Gilbert, también llamada *Chemical Cleavage Method* en inglés, se basa en la modificación química del ADN, rompiendo el esqueleto de este mismo en zonas adyacentes a los nucleótidos modificados. Con el avance de las técnicas y métodos científicos, el método Maxam-Gilbert ha sido modificado y en la actualidad se utiliza para eliminar posibles reactivos tóxicos que puedan dañar la estructura del ADN (Slatko, Gardner, & Ausubel, 2018)

En primer lugar, Sanger y Coulson crearon el denominado sistema *Plus and minus* en 1975. No obstante, el método que realmente desencadenó un avance titánico en el mundo de la secuenciación fue el método Sanger de 1977, de «terminación de cadena»: consiste en la adición de didesoxinucleótidos (ddNTPs)

terminales marcados radioactivamente, los cuales carecen del grupo 3'-OH, impidiendo de esta manera la elongación de la cadena de ADN. Sin embargo, uno de los grandes problemas de la secuenciación Sanger es que tiene una capacidad de lectura de alrededor de 150 pares de bases solamente, por lo que se utilizaba para conocer la secuencia de un solo gen, o para genomas de pequeño tamaño, de cerca de 5000 pares de bases como máximo (McCombie, McPherson, & Mardis, 2019).

La secuenciación Sanger se creó y utilizó para realizar la secuenciación del primer genoma completo de un organismo, el bacteriófago Φ X174, con aproximadamente 5000 nucleótidos distribuidos en 11 genes. Tras conseguir secuenciar el genoma de un organismo al completo, empezaron proyectos e investigaciones para estudiar el genoma de otros organismos, como *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000), llegando a plantear los comienzos del proyecto genoma humano (Garrido-Cardenas, Garcia-Maroto, Alvarez-Bermejo, & Manzano-Agugliaro, 2017).

Tras muchos avances y modificaciones de las técnicas de secuenciación, como el desarrollo de los secuenciadores automáticos basados en el uso de ddNTPs fluorescentes, hemos llegado hoy en día a lo que llamamos las técnicas denominadas nuevas técnicas de secuenciación *Next generation sequencing* (NGS por sus siglas en inglés), gracias a las cuales se ha ampliado de forma notable el mundo de la secuenciación de exomas. Previamente al desarrollo de estas herramientas se utilizaban técnicas mejoradas basadas en la secuenciación Sanger, la cual era efectiva, pero contaba con la reducida capacidad de lectura de menos de mil nucleótidos y requería de demasiadas horas para la poca carga de lectura que se le podía aportar (Heather & Chain, 2016).

Sin embargo, con las NGS se puede secuenciar cientos, miles de genes, o incluso un genoma completo en periodos de tiempo relativamente cortos (Qin, 2019). Esto significa que se pueden estudiar los genes, elementos genéticos y mutaciones causantes de enfermedades de una manera hasta ahora inaccesible, permitiendo avances titánicos tanto en genética como en otros ámbitos tales como clínica, microbiología, biología del desarrollo, bioquímica, etc.

1.1. Antecedentes

1.1.1. Evolución de los métodos de secuenciación

Uno de los grandes eventos que cambiaron para siempre el panorama científico en, principalmente, los ámbitos clínicos y genéticos, pero de todas las disciplinas en general, fue el desarrollo y publicación del proyecto genoma humano.

El proyecto genoma humano fue un evento de gran magnitud en el ámbito científico, que afectó de manera significativa a la visión de la secuenciación de exomas como método, y donde se desarrollaron nuevas técnicas de secuenciación. Este proyecto consistía en conocer la secuencia del genoma humano en su totalidad, ya que al obtener el genoma completo se podría acelerar aquellas investigaciones relacionadas con prácticamente todos los ámbitos científicos en los que figurasen los humanos como estudio, y en la biomedicina especialmente. Para realizar este proyecto de tan grandes dimensiones era imperativa la colaboración de laboratorios e instituciones científicas de todas partes del mundo, que trabajaron durante más de 10 años en estudios y experimentos mediante la realización de mapas genéticos. Se llegó a conseguir la obtención de más del 96 % de las regiones de eucromatina del genoma humano. Tras el proyecto genoma humano, se situaron como foco de estudio completar las regiones restantes (4 %) y la identificación de los exones y genes presentes en el genoma, y se abrió un gran campo de posibilidades respecto a la genómica, clínica, bioquímica, y muchos más (Lander et al., 2001).

Durante el proyecto genoma humano se tomaron dos vías para obtener la secuencia del genoma. Para empezar, el camino que siguieron desde el consorcio público consistió en la elaboración de mapas genéticos físicos para identificar la situación en el genoma de la librería de clones empleados (BAC, en el caso del proyecto genoma humano). Para los últimos años del proyecto genoma humano se unió una empresa privada denominada *Celera Genomics*, dirigida por el prestigioso científico Craig Venter, que optó por un nuevo método de secuenciación denominado método de secuenciación jerárquica shotgun, o shotgun de genoma completo.

Este método consiste en que partiendo de las librerías de clones de las cuales sabemos la secuencia de los extremos, dado que conocemos parcialmente las secuencias de los clones, podemos conseguir mediante programas informáticos una secuencia consenso derivada del solapamiento de aquellas regiones que compartan

el mismo código genético. Si existe algún hueco (también llamado *gap*, el término en inglés) entre las secuencias consenso, se puede secuenciar más individualmente para poder cerrarlos posteriormente mediante otros métodos (Clark & Pazdernik, 2013).

Las técnicas de secuenciación se han ido perfeccionando y actualizando. Una de las técnicas actuales de secuenciación masiva que se utiliza actualmente es la tecnología *Illumina*, desarrollada por *Solexa and Lynx Therapeutics* (Slatko et al., 2018), que posteriormente se unió a la empresa *Illumina, Inc.* (Ambardar, Gupta, Trakroo, Lal, & Vakhlu, 2016). Esta técnica, también llamada amplificación por puentes (*bridge amplification*) consiste en que mediante una librería de ADN con adaptadores en sus extremos, estos se utilizan como sustratos cuando se unen a unos oligonucleótidos de un soporte físico con secuencias complementarias a los adaptadores (Slatko et al., 2018). Cuando comienzan las amplificaciones por PCR en los puentes formados, un terminador reversible RT (*reverse terminator*) emite una fluorescencia diferente para cada base introducida en la cadena que está siendo sintetizada (Ambardar et al., 2016). La técnica *NextSeq*, una de las diferentes técnicas de *Illumina* basadas en este método, ofrece 120 Gb de información, con 400 millones de lecturas donde cada una tiene una capacidad de lectura de 2 x 150 pares de bases (Slatko et al., 2018). Estas técnicas además de ser muy efectivas y proporcionar una gran cantidad de información en un periodo corto de tiempo, tiene la ventaja de que por apenas 600 euros se puede obtener el genoma de un individuo. Para poner los datos en perspectiva, el primer genoma humano costó 4 mil millones de dólares.

Estos métodos más actuales, como las NGS, nos permiten apreciar una mayor efectividad en estos métodos para identificar las causas de determinadas enfermedades monogénicas y sus posibles fenotipos, y una efectividad intermedia para enfermedades con patrones y cuadros clínicos complejos como pueden ser síntomas tempranos de Alzheimer, o predecir los posibles mecanismos biológicos de algunos de los fenotipos asociados a estas enfermedades más impredecibles (Koboldt, Steinberg, Larson, Wilson, & Mardis, 2013).

La efectividad para el estudio de enfermedades complejas ha demostrado no ser tan práctica como para los casos mencionados anteriormente. La causa se atribuye a la gran dificultad que supone predecir predisposiciones genéticas de carácter complejo, ya que son necesarias más muestras para discernir relaciones que

se pueden haber establecido del propio ruido de las muestras de una correlación real. (Koboldt et al., 2013).

2.1.1. Enfermedades raras: situación actual

Las enfermedades raras se definen como aquellas patologías que afectan a un número limitado de la población, siendo en la Unión Europea el equivalente a menos de 5 afectados respecto a 10 000 individuos, o lo que es lo mismo, menos de 1 afectado por cada 2 000 personas. Actualmente, el número de enfermedades raras conocidas supera los 7 000, y de estas enfermedades un gran número está asociado a causas genéticas, siendo las congénitas una parte considerable de estas enfermedades (Federación española de enfermedades raras (FEDER); Centro de Referencia Estatal de Enfermedades Raras (CREER), 2018).

Para estudiar el impacto real que tienen las enfermedades raras en la población se toman dos enfoques. Mediante la prevalencia, que corresponde al número de casos diagnosticados de una enfermedad rara en un momento concreto; y la incidencia, que corresponde con el número de casos nuevos detectados de la condición que se está estudiando respecto a un grupo poblacional concreto, y en un período de tiempo previamente establecido. La prevalencia, en este caso, corresponde con los datos anteriormente mencionados que hacen referencia a que las enfermedades raras afectan a 5 de cada 10 000 personas (según los criterios seguidos en la Unión Europea y, por tanto, en España). El seguimiento de la incidencia se obtiene realizando una síntesis de datos aportados por el sistema de salud, como centros de salud u hospitales, registro de mortalidad, y otros. Dado que en España las competencias correspondientes de Sanidad dependen de las Comunidades Autónomas y cada una cuenta con una capacidad de recursos y criterios distinta según lo que cada comunidad considera adecuado, no existe un acuerdo generalizado sobre el registro de enfermedades raras. Debido a esta situación, entre otras razones, se creó junto un Registro Estatal de Enfermedades Raras dependiente del Ministerio de Sanidad, que tiene como objetivo evaluar y contrastar los datos recibidos de las comunidades. De hecho, el propio estudio ENSERio (Estudio sobre la Situación de Necesidades Sociosanitarias de las Personas con Enfermedades Raras) del que proceden estos datos se realizó gracias a la Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER) para conocer la situación y las necesidades reales de las personas

con enfermedades raras en España (Federación española de enfermedades raras (FEDER); Centro de Referencia Estatal de Enfermedades Raras (CREER), 2018)

En el estudio ENSERio se pone de manifiesto que la atención sociosanitaria recibida por parte de los pacientes con enfermedades raras tiene mucho margen para mejorar. Un 40,2 % de la población muestral que se evaluó se mostró insatisfecha con la atención sanitaria recibida, y en cuanto a la opinión de los encuestados sobre cómo se abordan multidisciplinariamente las enfermedades raras, un 50,14 % del total reveló que es de forma muy mala (25,14 %) o bastante mala (25 %). Además, los encuestados revelaron que la intercomunicación y coordinación entre servicios como atención primaria, atención especializada, etc. es bastante mala (33,02 %) o muy mala (26,12 %), lo que constituye un 59,14 % de encuestados del total (Federación española de enfermedades raras (FEDER); Centro de Referencia Estatal de Enfermedades Raras (CREER), 2018).

Además de los problemas mencionados con anterioridad, uno de los obstáculos más significativos para el registro correcto de los pacientes con enfermedades raras es el retraso del diagnóstico, conocido también como el problema de la *odisea diagnóstica*. El diagnóstico suele ser más complicado por el simple hecho de tener menos prevalencia/incidencia y no conocerse al detalle por los diferentes médicos especialistas, por lo que hay situaciones en las que pueden pasar muchos años sin recibirse un diagnóstico y, en consecuencia, un tratamiento adecuado. Esto provoca que los pacientes permanezcan durante años sin el tratamiento oportuno que habría podido mejorar distintos síntomas que, normalmente, se agravan con el tiempo. Además de otros factores importantes que generan inquietud en las familias afectadas como es la probabilidad de tener otros hijos afectados o de transmitir la enfermedad a las siguientes generaciones. Este proceso se conoce como *odisea diagnóstica* y es uno de los principales problemas relacionados con las enfermedades raras. Reducir en el mayor tiempo posible el retraso del diagnóstico es tremendamente necesario, ya que un diagnóstico temprano puede abrir las puertas a un tratamiento adecuado, impidiendo así algunas consecuencias del avance de la enfermedad, la aplicación de posibles tratamientos que no eran convenientes para la patología concreta o incluso cirugías que no tenían por qué ser necesarias. Para poder identificar cuanto antes la gran variedad de posibilidades a la que se pueden enfrentar los pacientes y las familias de estos, se debe consultar, en primer lugar, consejo genético, un proceso mediante

el cual se intenta identificar cómo se ha transmitido esa patología, cómo ha contribuido la genética familiar, u otros aspectos como las variantes médicas o psicológicas (Sawyer et al., 2016).

Por lo general, la demora del diagnóstico está relacionada con la edad de los pacientes de manera que cuanto menor es la edad, más rápido es el diagnóstico y apenas hay demora en este. Del total encuestado, un 18,91 % tuvo un retraso de entre 1 y 3 años en su diagnóstico, un 18,08 % entre 4 y 9 años de retraso, y un 18,65 % tuvo un retraso de diagnóstico de 10 años o más. Esto hace que un 55,64 % del total haya sufrido al menos 1 año de retraso en su diagnóstico. La principal causa de estos retrasos se debe a la falta de conocimientos de la enfermedad (72,8 % del total), y la repercusión e impacto del retraso del diagnóstico pueden ser fatales para los pacientes, de manera que durante este tiempo un 29,37 % indicó que no se le había proporcionado ningún tratamiento ni apoyo, y el 31,26 % de los pacientes reveló que, durante ese tiempo, los síntomas de su enfermedad o la propia enfermedad sufrieron un agravamiento (Federación española de enfermedades raras (FEDER); Centro de Referencia Estatal de Enfermedades Raras (CREER), 2018).

Por todo esto, es de imperiosa necesidad facilitar el diagnóstico de enfermedades raras (ER) e invertir recursos en instalaciones, infraestructuras y personal que permita no solo un correcto y rápido diagnóstico de ER, sino también de otras patologías, mediante herramientas y métodos como realizar una secuenciación del exoma completo. La secuenciación del exoma completo además de ser una alternativa mucho menos invasiva que otras pruebas (como biopsias), podría evitar el uso de material y aparatos (como por ejemplo escáneres TAC) como método de diagnóstico (tras el diagnóstico, estos aparatos y materiales se suelen utilizar para analizar la evolución de los pacientes), así como especialistas e instalaciones durante el periodo diagnóstico al que nos enfrentaríamos durante todo el proceso que conlleva la odisea diagnóstica (Sawyer et al., 2016).

3.1.1. Sistema Nervioso Periférico y Charcot-Marie-Tooth

En el organismo, el sistema nervioso está compuesto por el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP), ambos constituidos por agrupaciones de neuronas (la unidad funcional del sistema nervioso) llamadas nervios. Las neuronas son células sensibles a la excitación que transmiten el impulso

nervioso mediante componentes electroquímicos. Normalmente, una neurona suele estar compuesta por un cuerpo celular, un axón desde donde se transmite el impulso nervioso, y dendritas que reciben dicho impulso nervioso (Ludwig & Varacallo, 2019). Las neuronas se pueden clasificar en distintos tipos, atendiendo a dónde se encuentren o a la función que realizan. En la variedad existente en cuanto a las neuronas, podemos ver que la gran mayoría de los axones pueden estar recubiertos de una capa mielinizante, que contribuye de manera positiva en la velocidad del impulso nervioso. Esta capa de mielina no es continua a lo largo de todo el axón, sino que se distribuye en varios segmentos separados unos de otros y es producida gracias a los oligodendrocitos en el SNC, y por las células de Schwann en el SNP. Las secciones que quedan al descubierto entre los segmentos mielinizados se denominan nódulos de Ranvier (Raine, 1999).

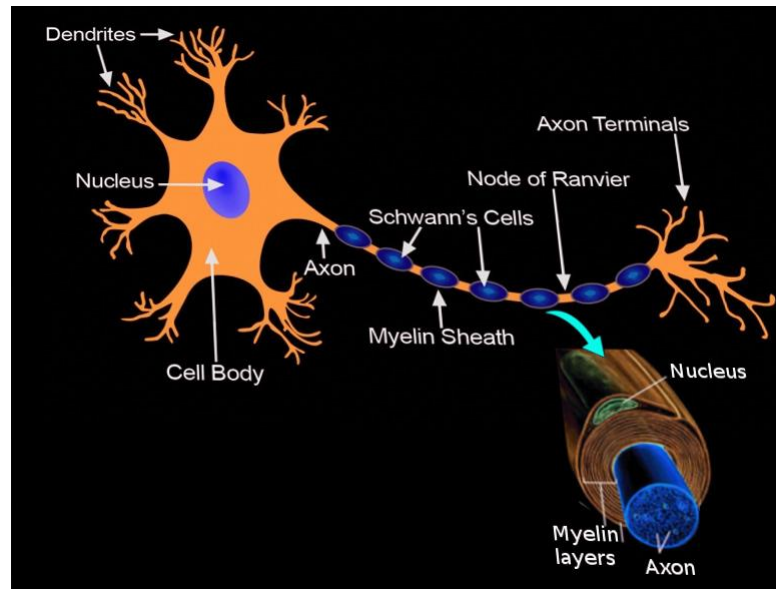


Figura 1: Estructura básica de una neurona periférica. Extraído de Fallon M, Tadi P. *Histology, Schwann Cells*. [Updated 2020 May 23]

El sistema nervioso central se encarga de funciones como la memoria, la inteligencia, la comunicación y otras muchas funciones, pero su principal labor es la de generar respuestas acordes a los estímulos recibidos desde el sistema nervioso periférico y enviar dicha respuesta a los nervios periféricos para que se ejecute la respuesta. Está compuesto del córtex cerebral, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, puente tronco encefálico, bulbo raquídeo, cerebelo, sistema límbico, formación reticular y la médula espinal (Thau, Reddy, & Singh, 1943).

El sistema nervioso periférico está compuesto por los nervios periféricos y órganos y receptores especializados. Los nervios periféricos son los conectores de estos receptores con el sistema nervioso central. Dependiendo de la información que lleven estos nervios, se denominan nervios sensitivos o nervios motores. Los

sensitivos se encargan de recibir información de los diferentes estímulos de los órganos sensoriales (tanto externos como internos) y trasladar dicha información hasta el sistema nervioso central con el fin de elaborar una respuesta acorde al estímulo transmitido. Los nervios motores se encargan de ejecutar la respuesta producida por el sistema nervioso central, ya sea llevando la información hacia un músculo esquelético (sistema nervioso somático) o bien a músculo liso, músculo cardíaco o a una glándula (sistema nervioso autónomo). Dentro del sistema nervioso autónomo podemos diferenciar el sistema simpático y el sistema parasimpático, los cuales se diferencian en que los ganglios (acumulaciones localizadas de células nerviosas y acompañantes) en el simpático se distribuyen alrededor de la columna vertebral, y en el parasimpático los ganglios se distribuyen en el interior de los órganos internos que inervan. Además, existe un sistema nervioso entérico compuesto por pequeños ganglios localizados por las paredes de los órganos viscerales (Purves et al., 2001).

En las patologías relacionadas con la enfermedad Charcot-Marie-Tooth (CMT, también conocida como neuropatía hereditaria motora y sensorial HMSN, siglas en inglés) existen una serie de polineuropatías del SN Periférico donde generalmente, las personas afectadas por este síndrome presentan neuropatías motoras y sensoriales crónicas en brazos y piernas de forma simétrica y con progresión lenta, lo que puede desembocar en debilidad y, finalmente, atrofia de manos y pies (Bird, 1993). Se han registrado distintos tipos de CMT, y su clasificación y características se describirán más adelante en este trabajo.

2. OBJETIVOS

Realizar una revisión sobre el impacto de las nuevas técnicas de secuenciación de exomas como diagnóstico de enfermedades raras, estudiando concretamente el síndrome Charcot-Marie-Tooth.

3. NGS COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

El gran avance que se ha conseguido al desarrollar las nuevas técnicas de secuenciación de exomas es que apenas se necesita un día para secuenciar un genoma entero y, si comparamos este tiempo con los 10 años que se necesitaron para poder secuenciar el genoma humano, se pone claramente de manifiesto que estas técnicas son el futuro no sólo para la secuenciación de nuevos organismos, sino para

las pruebas clínicas y genéticas. Generalmente, aunque hay varias plataformas con distintos mecanismos de secuenciación, todas las NGS siguen el procedimiento de secuenciar millones de fragmentos de ADN a la vez, y mediante programas informáticos se mapean cada secuenciación individual frente a un mapa genómico humano de referencia (Behjati & Tarpey, 2013).

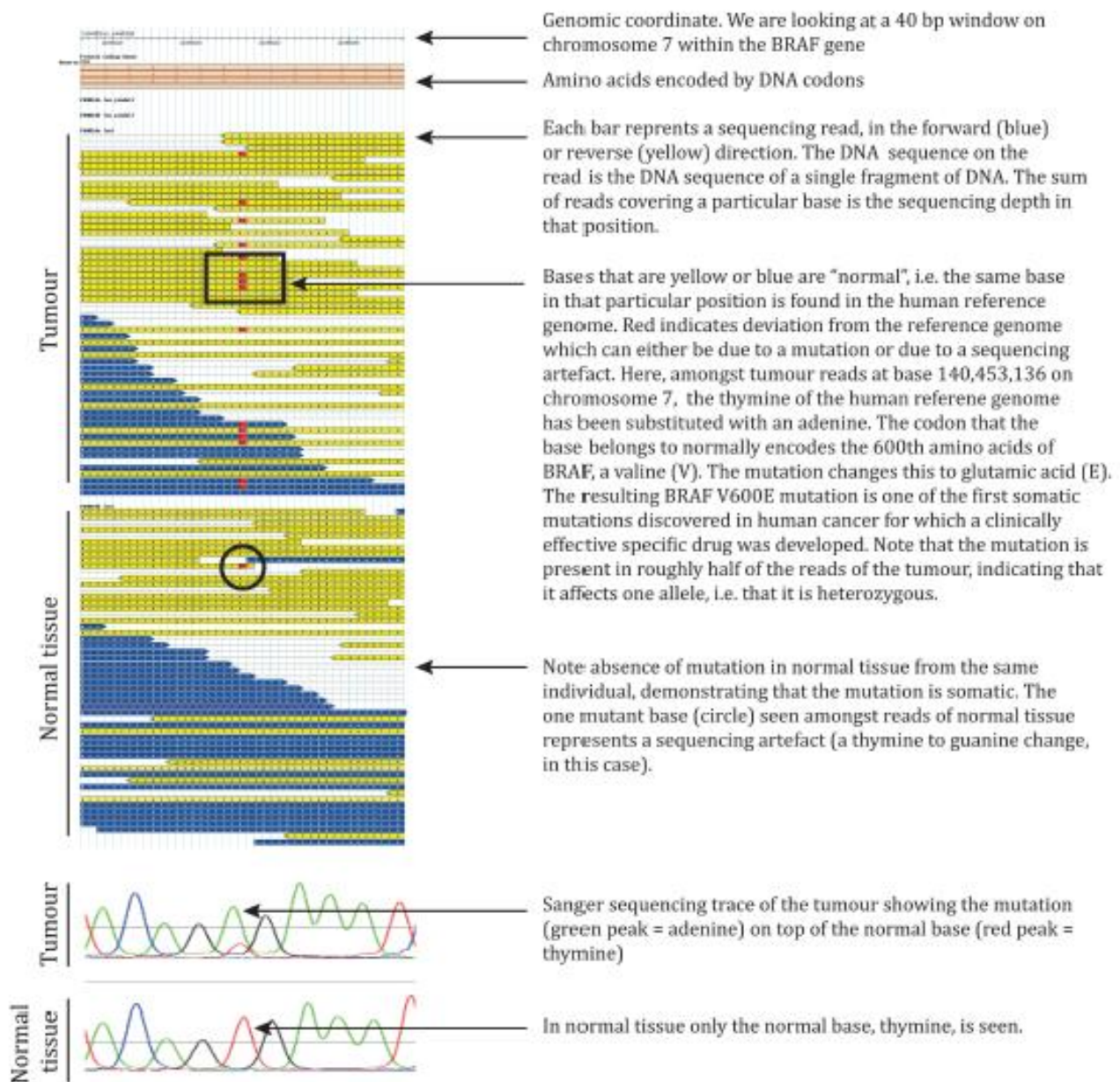


Figura 2: Ejemplo de NGS para datos en bruto para la mutación BRAF V600E en melanoma.

Extraído de Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2013 Dec;98(6):236-8. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340. Epub 2013 Aug 28.

Cuando comparamos el genoma del individuo al que se le ha secuenciado con el mapa de referencia, podríamos observar claramente una por una aquellas bases concretas o segmentos del ADN que o bien no coinciden, o la presencia de repeticiones o deleciones. Para aquellos casos en los que haya diferencias entre el genoma secuenciado y el genoma de referencia, se comprueba si los nucleótidos o segmentos no coincidentes son polimorfismos conocidos, como pueden ser los SNP o los distintos alelos registrados para esa zona cromosómica determinada. También se evalúa si existe interrelación entre las diferencias observadas y fenotipos patogénicos (Dewey, Pan, Wheeler, Quake, & Ashley, 2012).

La parte informática de las NGS es un proceso consistente de tres pasos, donde en cada uno se realiza un análisis diferente de los datos. En el primer análisis se procesan los datos en bruto obtenidos de las lecturas de los aparatos de NGS. A continuación, se realiza un segundo análisis donde se alinean las secuencias de la muestra con una secuencia de referencia y se ponen de manifiesto las diferencias entre las secuencias. El último análisis consiste en evaluar y discernir si las diferencias encontradas son correctas o se deben a errores y otras causas (Di Resta, Galbiati, Carrera, & Ferrari, 2018)

En un principio, evaluando grupos grandes de casos y sus respectivos controles para estudiar la frecuencia alélica en el genoma se podría ver correlaciones entre los alelos frecuentes que causaban enfermedades. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, en enfermedades complejas no siempre se pueden observar correlaciones claras entre estos. Generalmente debido a que una enfermedad compleja puede estar constituida por varias enfermedades a priori indistinguibles, con diferentes bases moleculares o fisiopatológicas, o bien porque estas enfermedades pueden surgir como resultado de la mutación de varios genes simultáneamente. En ocasiones se han descrito enfermedades diferentes en función de la región génica mutada, como ocurre en la esclerosis lateral amiotrófica y el Charcot-Marie-Tooth de tipo axonal donde además se solapan cuadros clínicos y similitud en cuanto al daño provocado por las patologías (Gentile et al., 2019). Esto planteó un nuevo enfoque, que consistía realizar estudios de asociación del genoma completo (GWAS, Siglas en inglés), que reveló la importancia del estudio de polimorfismos de un único nucleótido (SNP, siglas en inglés). Los GWAS ha impulsado las líneas de investigación relacionadas con la estructura poblacional, con el estudio

de las enfermedades complejas y en el estudio de los rasgos antropomórficos. Sin embargo, donde han tenido más impacto ha sido en la farmacogenética, que permite conocer a priori la dosis aproximada de tratamiento que se le tiene que administrar a los pacientes según su particular estructura genética, lo cual se traduce en unos resultados muy positivos. (Koboldt et al., 2013). Para poder realizar este tipo de estudios es necesario elaborar una base de datos de gran tamaño sobre genes y la implicación clínica que tienen, para poder evitar problemas relacionados con el tamaño de la muestra y evitar el ruido que esta misma puede provocar (Khromykh & Solomon, 2015).

En este trabajo nos vamos a centrar concretamente en las aplicaciones de las NGS para el diagnóstico de enfermedades raras y particularmente para las polineuropatías hereditarias Charcot-Marie-Tooth, pero considero necesario poner de manifiesto que la mayoría de las patologías se verían muy beneficiadas de una inversión en equipo y especialistas para facilitar el diagnóstico mediante las NGS como, por ejemplo, las relacionadas con los genes que pueden desarrollar un cáncer. (Behjati & Tarpey, 2013). De hecho, en oncología ya se utilizan las NGS para determinar la malignidad de algunos genes concretos (Di Resta & Ferrari, 2018)

A pesar de que los propios aparatos, instalaciones y especialistas necesarios para realizar las secuenciaciones de genoma completo (GWS, siglas en inglés de genome-wide sequencing) son relativamente caros, se pueden subcontratar la GWS a laboratorios que ya poseen los equipamientos y experiencia necesarios. Un estudio realizado en Columbia Británica (Canadá) reveló que el coste de la GWS en los primeros años de diagnóstico en niños con una posible enfermedad genética se situaba alrededor de 2200 C\$ (dólares canadienses) por paciente, y que durante el progreso del diagnóstico a lo largo de los años se redujo el coste hasta cerca de 500 C\$ por paciente. (Dragojlovic et al., 2020). Otro estudio puso de manifiesto que, como norma general, los padres y familiares de niños con enfermedades raras preferían pagar secuenciaciones de exomas de alrededor de 5000 \$ (estadounidenses) frente a esperar cerca de 5 años de media para obtener un diagnóstico por otros procedimientos que, a la larga, podrían suponer más tiempo o más dinero (Marshall et al., 2019).

Se ha observado que realizar los diagnósticos mediante WGS resulta especialmente efectivo si se realiza en bebés y niños, ya que permiten un mejor estudio de la etiología molecular durante los primeros años del desarrollo y esta puede reflejarse en una mayor posibilidad de obtener resultados positivos. Además, puede permitir realizar algunas intervenciones determinadas que contribuyan a mejorar el seguimiento clínico y así como acciones como la selección genética preimplantacional o un consejo genético en otros miembros de la familia afectada (Smith et al., 2019).

4. CHARCOT-MARIE-TOOTH

4.1. Historia y características

	Etiology	Risk factors	Pathology	Clinical features	Management
ACQUIRED DEMYELINATING DISEASE					
Guillain-Barre syndrome	Unknown	Antecedent infections: C. jejuni, M. pneumoniae, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, varicella zoster virus Trauma Surgery Vaccination	Segmental demyelination Inflammatory (macrophage, lymphocyte) infiltrates	Acute ascending symmetric paralysis, paresthesia, choking, difficulty in breathing, autonomic dysfunctions (hours to several days)	Supportive therapy Plasma exchange IVIG
Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy	Unknown	Autoimmunity	Segmental demyelination Thin myelin sheath Onion bulb (short internodes) formation Perivascular inflammatory infiltrates	Slow, progressive neurological deficits such as tingling, numbness, symmetrical weakness of limbs, paresthesia of limbs, loss of reflex, ataxia, limb incoordination. (slow, progressive)	Glucocorticoids Plasmapheresis IVIG
Anti-Myelin Associated Glycoprotein (MAG) neuropathy	MAG IgM monoclonal gammopathy		Segmental demyelination, Immunoglobulin deposits	Benign, minimal distal muscle weakness, progressive sensory ataxia, tremors. (several years)	Supportive therapy (exercise, balance training) Corticosteroids, IVIG, Plasmapheresis (rarely effective)
POEMS syndrome	Unknown (paraneoplastic syndrome)	Plasma cell neoplasm	Endothelial cell hypertrophy with disrupted tight junction No inflammatory infiltrates No immunoglobulin deposition	Polyneuropathy (paresthesia, motor weakness, sensory disturbance), organomegaly (hepatomegaly, lymphadenopathy), endocrinopathy (testicular atrophy, gynecomastia), paraproteinemia (M-protein), skin changes (hyperpigmentation, hypertrichosis), peripheral edema	High dose chemotherapy Stem cell transplant Corticosteroids Alkylator therapy Radiation therapy Supportive therapy
INHERITED DEMYELINATING DISEASE					
Charcot Marie Tooth disease	Mutations of genes (PMP22, P0, connexin 32, mitofusin-2, etc.)		Segmental demyelination Onion bulb formation	Distal muscle weakness, foot drop, scoliosis, hammer toes, neuropathic pain, fatigue, sensory disturbance (slow, not progressive)	Supportive therapy (exercise, muscle training, balancing)

Figura 3: Peripheral Demyelinating Diseases: From Biology to Translational Medicine. Kamil, K., Yazid, M. D., Idrus, R. B. H., Das, S., & Kumar, J. (2019). Peripheral Demyelinating Diseases: From Biology to Translational Medicine. Frontiers in Neurology, 10, 87.

Los primeros que incluyeron la descripción de estas neuropatías en el campo

médico fueron Friedreich y Eichhorst por separado en 1873. Sin embargo, los neurólogos Charcot, Marie y Tooth describieron el factor hereditario y familiar del que dependían estas neuropatías periféricas en el año 1886. No fue hasta más adelante en 1968 cuando los científicos Dyck y Lambert publicaron la primera clasificación de los diferentes tipos de CMT acorde a las particularidades de velocidad de transmisión y conducción del impulso nervioso, es decir, a las cualidades electro-físicas. Registraron dos tipos, el CMT1 que correspondía al de menor conductividad nerviosa, y el CMT2 donde la conductividad apenas se había visto afectada (Jani-Acsadi, Ounpuu, Pierz, & Acsadi, 2015)

Las neuropatías relacionadas con el síndrome Charcot-Marie-Tooth son el grupo más extenso de patologías de carácter hereditario de enfermedades neuromusculares (Martyn & Hughes, 1997) con más de 80 genes relacionados con este grupo de poli neuropatologías, y la mayoría de los cuales se ha descubierto en estos últimos años gracias a NGS (Pareyson, Saveri, & Pisciotta, 2017)

Sin embargo, no se ha publicado un gran número de estudios sobre estas patologías dentro del campo de la literatura científica, por lo que el conocimiento de la base molecular de la enfermedad CMT no sido muy abundante hasta hace relativamente poco. Esto se atribuye a la falta de investigaciones y estudios sobre la progresión de la enfermedad en el transcurso del tiempo, junto a la escasez de casos recopilados a nivel nacional e internacional y la falta de pruebas analíticas estandarizadas. Todo esto desemboca en un retraso de diagnóstico que sufren gran parte de los pacientes con CMT, siendo este retraso generalizado de 10 años aproximadamente (Jani-Acsadi et al., 2015).

Dentro de las patologías del CMT podemos observar distintos patrones hereditarios que pueden ser bien autosómicos dominantes, autosómicos recesivos, o ligados al cromosoma X. Además de estos patrones, podemos establecer una división de los tipos de CMT según sus comportamientos y características eléctricas y fisiológicas, separando en esta clasificación los tipos axonal desmielinizante e intermedio. Estos dos factores reflejan la gran heterogeneidad genética presente en el CMT (Morena, Gupta, & Hoyle, 2019).

A nivel molecular, este grupo de enfermedades se traduce en patologías relacionadas con la síntesis proteica o su modificación postraducciona, con el

transporte celular a través del citoesqueleto del axón, con un mal funcionamiento de las mitocondrias, o de los canales iónicos (Morena et al., 2019).

En el aspecto clínico se han observado 3 cuadros clínicos diferentes:

- El predominante consiste en un correcto desarrollo psicomotriz en la infancia con un incremento paulatino de debilidad y pérdida sensitiva en las piernas, durante la primera y tercera década del desarrollo, con la futura aparición del denominado pie cavo y manifestándose debilidad también en las manos. Durante las revisiones y exámenes médicos se evalúan los reflejos, que generalmente o no se dan o se dan de manera muy leve.
- El segundo cuadro clínico está caracterizado por aparecer durante el primer año de vida, y cuyos síntomas consisten en un retraso al andar, torpeza en movimientos o andar de puntillas. Las pautas que se suelen seguir consisten en el uso de andadores y aparatos ortopédicos en las piernas.
- El tercero se da, de modo general, en pacientes de mediana edad (40 años) con síntomas similares al primer grupo, y donde la evolución depende de cada caso.

Generalmente uno de los primeros síntomas por los que se suele sospechar de un caso CMT es por una aparición de deformación de pies, como puede ser el pie cavo o los dedos martillo, aunque estas deformaciones pueden deberse a otras enfermedades neurológicas o enfermedades en el desarrollo, e incluso pueden darse sin estar asociada a ninguna otra patología. También se han descrito otros síntomas que pueden estar relacionados con el CMT como pérdida auditiva o displasia de cadera, aunque no son tan comunes (Ramchandren, 2017).

Una evaluación muy importante es la capacidad electro-física de la conductividad nerviosa de los pacientes para poder determinar el grado de daño nervioso, la presencia de otras posibles neuropatías, y si nos encontramos ante el comportamiento del tipo axonal o desmielinizante del CMT que estamos evaluando. Sabemos que es desmielinizante cuando la velocidad conductora del impulso nervioso (NCV, siglas en inglés) es inferior a 38 metros/segundo (también se han descrito otros valores de referencia de 35 m/s, pero generalmente se utilizan los 38 m/s) (Ramchandren, 2017).

Otra cuestión casi imperativa es contar con un árbol genealógico familiar a ser

posible de tres generaciones o más, donde se obtenga información sobre si algún familiar murió a corta edad, si existe consanguinidad o si han existido algunos individuos con problemas de movilidad al andar o los síntomas anteriormente mencionados. Sin embargo, hay casos en los que no se pueden diagnosticar de manera tan sencilla, como por ejemplo en aquellos árboles genealógicos en los que se desconoce la información familiar, o en los casos en los que las mutaciones surgen de Novo (Ramchandren, 2017). Gracias al árbol genealógico se puede obtener, además, si la herencia de la patología es autosómica dominante, recesiva, o ligada al cromosoma X, permitiendo mediante este medio hacerse una idea sobre la variante a la que nos enfrentamos en cada caso concreto, y poder evaluar el riesgo de otros familiares a desarrollar la enfermedad (Bird, 1993).

4.2. Clasificación y Genética

Tipos	Fenotipo	NCV (m/s)	% casos de CMT	Herencia	Genes relacionados
CMT1	desmielinizante	<38	50 – 80	Dominante	<i>PMP22, MPZ</i>
CMT2	Axonal	>38	10 - 15	Dominante	<i>MFN2, MPZ, GDAP1</i>
Forma Intermedia	Desmielinizante	>25 <38	Menos del 4	Dominante	<i>MPZ</i>
CMT4	Desmielinizante o axonal	Baja NCV (diferentes fenotipos)	Muy raro	Recesivo	<i>GDAP1</i>
CMTX	Desmielinizante	30-40	10 - 15	Ligado al cromosoma X	<i>GBJ1</i>

Figura 4: Características de los principales tipos de CMT. Modificado de: Jani-Acsadi, A., Ounpuu, S., Pierz, K., & Acsadi, G. (2015, junio 1). *Pediatric Charcot-Marie-Tooth Disease*. *Pediatric Clinics of North America*, Vol. 62, pp. 767-786. Ramchandren, S. (2017, octubre 1). *Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Genetic Polyneuropathies*. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, Vol. 23, pp. 1360-1377.

Como se ha descrito anteriormente, la primera clasificación separó este conjunto de patologías en dos variantes diferentes de CMT según las características electro-físicas del impulso nervioso: la variante CMT1, donde el impulso nervioso se veía ralentizado por su carácter desmielinizante; y la variante CMT2, la cual no experimentaba una disminución en la velocidad del impulso nervioso (Bird, 1993). Más adelante, se definió una variante que se describió como un tipo intermedio entre el CMT1 y el CMT2, ya

que no llegaba a cumplir los requisitos de conductividad nerviosa descritos para ninguno de los dos tipos (entre 30-40 m/s). Otras características que apoyaron el hecho de que se había descubierto una variante distinta a las descritas con anterioridad de CMT fueron los resultados de biopsias nerviosas realizadas a los pacientes de este tipo concreto, donde se ponía de manifiesto que a pesar de presentar desmielinización en las fibras nerviosas (CMT1) también se observaban mecanismos de reparación y regeneración del tejido nervioso (CTM2) (Berciano et al., 2017).

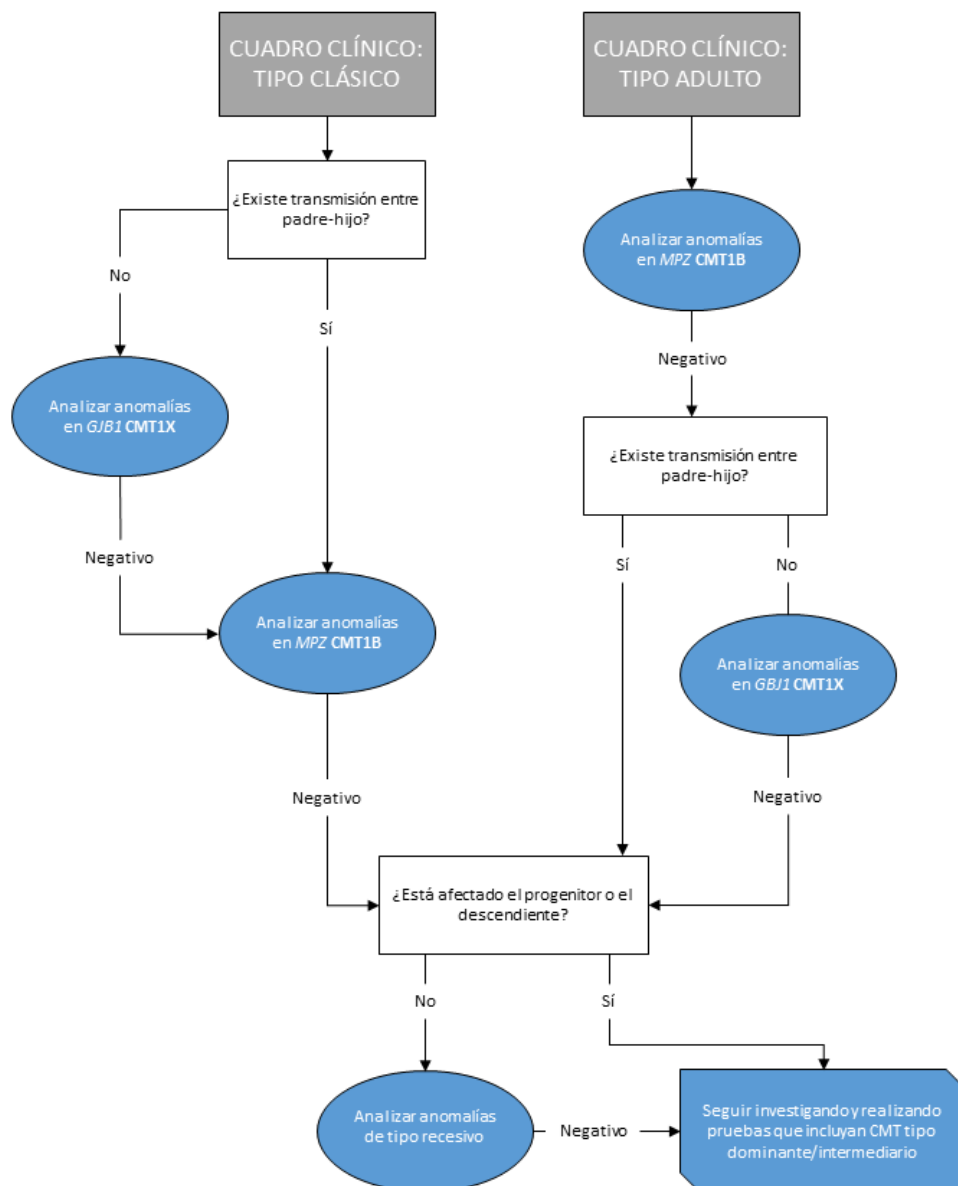


Figura 5: Algoritmo para diagnosticar genéticamente pacientes de CMT con NCV normales y pérdida axonal. En cursiva los genes, en negrita el subtipo de CMT. Modificado de Ramchandren, S. (2017, octubre 1). Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Genetic Polyneuropathies. CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology, Vol. 23, pp. 1360-1377.

Se han llegado a describir dos tipos más de CMT, además de los mencionados anteriormente. atendiendo en su descripción al patrón de herencia que presentan, a los que se ha denominado CMT4 y CMTX. Los tipos CMT1, CMT2 e intermedio tiene un patrón hereditario de tipo autosómico dominante. Sin embargo, el CMT4 tiene una herencia de tipo autosómica recesiva, y en el CMTX la herencia está ligada al cromosoma X. La variante CMT4 está caracterizada por ser desmielinizante, pero con un rango variable de posibles fenotipos. La variante CMTX tiene características axonales, aunque con tendencia a la degeneración y la presencia de anomalías en la mielina. Mencionar también que aunque estos sean los 5 tipos principales de CMT, para cada uno de estos existe una gran cantidad de subtipos, siendo el conjunto de casi 50 subtipos distintos de las variantes de CMT (Ramchandren, 2017).

Debido a la gran amplitud de síntomas comunes para varios tipos y subtipos, para identificar el gen o los genes causantes de la patología y así realizar un diagnóstico adecuado para el caso al que nos enfrentamos, se pueden realizar algoritmos de diagnóstico como se puede ver en la Figura 5. Consiste en un diagrama mediante el cual, al realizar pruebas genéticas determinadas y mediante preguntas sobre la historia familiar, se puede llegar fácilmente al tipo y subtipo concreto de CMT que estamos intentando diagnosticar (Ramchandren, 2017).

Evidentemente estos algoritmos de diagnóstico no son infalibles, y gracias al consejo genético se pueden barajar las distintas pruebas diagnósticas y las posibilidades al alcance de la familia y del individuo, proporcionando el método diagnóstico con mejor costo-beneficio para los pacientes. De esta manera, al igual que se valora este tipo de diagnóstico mediante algoritmos, también se valora la posibilidad de utilizar las NGS. El diagnóstico mediante las NGS permite rastrear paneles de genes candidatos en busca de posibles mutaciones, como pueden ser mutaciones en los principales genes que causan la mayoría de los fenotipos (casi el 90 %) entre los que se encuentran los genes *PMP22*, *MFN2*, *MPZ* y *GJB1* (Ramchandren, 2017).

Sin embargo, aunque gracias a la investigación y a los estudios realizados se han podido describir la gran cantidad de subtipos de CMT, además de identificar un número considerable de los genes que están relacionados con estos subtipos de CMT y su herencia, la forma de clasificación de los distintos tipos y subtipos de CMT es, en

última instancia, muy enrevesada, por lo que se ha propuesto una nueva clasificación basada en los genes implicados, no solo en las polineuropatías referidas al CMT, sino a todas las neuropatías hereditarias. Sin embargo, se puede utilizar la clasificación previa para el CMT como hemos mencionado con anterioridad (Magy et al., 2018).

En este trabajo vamos a hablar principalmente sobre 4 de los genes involucrados con más frecuencia en el CMT.

Un gran porcentaje del número de casos de CMT está relacionados con el gen *PMP22*. La proteína para la que codifica este gen, la proteína de mielina periférica 22 (*PMP22*), se expresa principalmente en las células de Schwann (Figura 1), en la zona compacta de la cubierta de mielina. Esta proteína corresponde a aproximadamente un 5 % de la mielina presente en el sistema nervioso periférico (Snipes, Suter, Welcher, & Shooter, 1992). Las mutaciones patogénicas en este gen suelen ser o bien por variación en el número de copias del gen en el cromosoma 17p12 (dando lugar al subtipo CMT1A) (Valentijn et al., 1992), o por transversión de guanina a citosina en el tercer exón, en el nucleótido 248 (subtipo CMT1E, en el cual el paciente sufre además sordera) (Joo, Ki, Joo, Huh, & Kim, 2004). Existen más mutaciones en este gen que dan lugar al CMT, pero hemos mencionado las más destacadas. El modo de herencia para estas mutaciones es autosómico dominante, y da lugar a una neuropatía de tipo desmielinizante (Bird, 1993).

El gen *MPZ*, que codifica para la proteína-cero de mielina (*MPZ*), se encuentra en la región cromosómica comprendida entre 1q21-q23 (Pham-dinh et al., 1993), es exclusiva del SNP, sólo se expresa en las células de Schwann, y es la proteína más importante de la mielina periférica (Lemke & Axel, 1985). Consta de 6 exones, y las mutaciones responsables de la patogenicidad se suelen encontrar en el tercer exón, donde se han descrito dos sustituciones en las que la isoleucina en la posición 135 pasa a treonina, o la glicina en la posición 137 pasa a serina (subtipo CMT1B) (Hayasaka et al., 1993). Otra de las mutaciones que puede tener lugar es la transversión de una guanina a timina en el segundo exón, lo que da lugar a que el aspartato en la posición 6 se convierta en tirosina (subtipo CMT1D, de tipo intermedio) (Mastaglia et al., 1999). Mencionar por último para este gen un cambio en el exón 3 de treonina en la posición 124 a metionina (subtipo CMT2J) (Senderek et al., 2000). Para estas mutaciones, su herencia es de tipo autosómica dominante, y sus

características neurológicas pueden ser desmielinizante (CMT1B), intermedio (CMTID), o axonal (CMT2J) (Bird, 1993).

A continuación, tenemos gen *MFN2*, que codifica para la mitofusina 2 (MFN2). Las mitofusinas 2 se encargan de las fusiones y separaciones que confieren a las mitocondrias su distribución interna y morfología dependiendo del tipo celular, del estado fisiológico, etc. (Santel & Fuller, 2001). El gen se encuentra en el cromosoma 1p36.22, y posee 19 exones (Casasnovas Pons et al., 2010). Se han descrito varias mutaciones diferentes, lo que ha resultado en un grupo heterogéneo de pacientes con patologías similares pero en las que variaban de manera leve los cuadros clínicos, y curiosamente su modo de herencia, siendo en algunos casos autosómico dominante (subtipo CMT2A2A) y en otros autosómico recesivo (CMT2A2B) (Calvo et al., 2009). Todas las mutaciones en este gen desembocan en neuropatías de tipo axonal (Bird, 1993).

Por último, *GJB1* codifica para las proteínas que forman parte de las uniones gap, las conexinas. Las uniones gap permiten intercambiar y transferir moléculas de pequeño tamaño e iones entre distintas células que se encuentren adyacentes. En este caso, el gen que en concreto sufre la mutación y da lugar al CMT (subtipo CMT1X) se encuentra en uno de los cromosomas sexuales, en Xq13.1. Concretamente, se ha visto que este gen se expresa en los nervios periféricos mielinizados, y por tanto su mutación afecta de forma directa a la mielinización periférica (Bergoffen et al., 1993). Las neuropatías resultantes de mutaciones en este gen son de tipo axonal, desmielinizante y de tipo intermedio, y su herencia está ligada al cromosoma x (Bird, 1993).

Durante el proceso de obtención de diagnóstico, o tras la obtención de este, se suele recurrir a consejo genético. En el caso del CMT, el consejo genético se centra en el tipo de herencia ante la que nos encontramos para poder evaluar posibles riesgos de que los familiares puedan desarrollar la patología. Si nos encontramos frente al caso de herencia tipo autosómica dominante, normalmente uno de sus padres estaba afectado de CMT salvo en los pocos casos en los que se haya dado *de Novo*, en cuyo caso se recomienda realizar pruebas genéticas a los padres. Generalmente los hijos del primer paciente diagnosticado tendrán un 50 % de posibilidades de desarrollar CMT (Bird, 1993).

En aquellos casos en los que nos encontremos frente a un caso autosómico recesivo, uno de los progenitores del paciente debe ser portador de la enfermedad de forma heterocigótica, y por tanto no desarrolla la enfermedad. Si el paciente tiene hijos, siempre que no sea con otro individuo que tenga CMT, sus hijos serán heterocigotos portadores obligados. Para evaluar si un miembro de la familia es portador, primero se debe conocer el tipo (y subtipo) concreto presente en la familia (Bird, 1993).

El último tipo de herencia que falta por mencionar es la ligada al cromosoma X. En este caso, tenemos que separar el riesgo de los hombres del riesgo de las mujeres en la familia. En cuanto a los padres de un paciente hombre, el padre nunca será portador para CMT (ya que, si lo fuese, lo hubiese desarrollado). Los hijos que tenga, siempre que sean hombres, no serán ni portadores ni desarrollarán la enfermedad, mientras que las hijas serán portadoras obligadas. En el caso de la madre, sin embargo, puede ser o bien portadora, o presentar mosaicismo de forma que no todos sus óvulos portarían la enfermedad. Para el caso de una paciente mujer, uno de sus padres debe de haberle transmitido la variante patogénica. Si este no es el caso, ha habido una variante *de Novo*, para lo cual siempre es recomendable realizar pruebas genéticas a los padres. Las posibles hijas que tenga la mujer paciente serán portadoras heterocigotas, y las que sean portadoras tendrán un 50 % de posibilidades de transmitirle la variante patogénica a su descendencia. Los hijos que hereden la variante patogénica desarrollarán la enfermedad (Bird, 1993).

Como he mencionado antes, estas patologías no son causadas únicamente por estos genes, sino que hay una gran lista de genes implicados que se incluye a continuación donde se recogen 74 de los genes conocidos causantes de CMT.

Gen	Herencia	Fenotipo/Tipo de neuropatía	GeneReview / OMIM / Referencia	Otros nombres
Genes más comunes				
GDAP1	AR	Axonal	GDAP1-Related Hereditary Motor and Sensory Neuropathy	CMT2K
	AR	Axonal/desmielinizante /intermedio		CMT4A CMT2H

Gen	Herencia	Fenotipo/Tipo de neuropatía	GeneReview / OMIM / Referencia	Otros nombres
				CMT2K CMTRIA
	AD, AR	Axonal	OMIM 607831	
<i>GJB1</i>	XL	Axonal/ desmielinizante /intermedio	Charcot-Marie-Tooth Neuropathy X Type 1	CMT1X
<i>HINT1</i>	AR	Axonal	OMIM 601314	
<i>MFN2</i>	AD, AR	Axonal	Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A	CMT2A2A /B
<i>MPZ</i>	AD	Axonal/ desmielinizante /intermedio	OMIM 118200	CMT1B CMT2I/J DI-CMTD
<i>PMP22</i>	AD	Desmielinizante	OMIM 601097	CMT1A CMT1E
<i>SH3TC2</i>	AR	Axonal	Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 4C	CMT4C
<i>SORD</i>	AR	Axonal /intermedio	Cortese et al [2020]	
Otros genes				
<i>AARS1</i>	AD	Axonal	OMIM 601065	CMT2N
<i>ABHD12</i>	AR	Desmielinizante	OMIM 613599	PHARC
<i>AIFM1</i>	XL	Axonal	OMIM 300169	CMTX4
<i>ARHGEF10</i>	AD	Desmielinizante	OMIM 608136	
<i>ATP1A1</i>	AD	Axonal	Lassuthova et al [2018]	

Gen	Herencia	Fenotipo/Tipo de neuropatía	GeneReview / OMIM / Referencia	Otros nombres
<i>ATP7A</i>	XL	Axonal	ATP7A-Related Copper Transport Disorders , OMIM 300011	
<i>BAG3</i>	AD	Axonal	OMIM 603883	
<i>BSCL2</i>	AD	Axonal	BSCL2-Related Neurologic Disorders / Seipinopathy	dHMN5A
<i>CNTNAP1</i>	AR	Axonal/ desmielinizante	OMIM 602346	
<i>COA7</i>	AR	Axonal	Higuchi et al [2018]	
<i>DCTN1</i>	AD	-	OMIM 601143	dHMN7B
<i>DCTN2</i>	AD	Axonal	OMIM 607376	
<i>DGAT2</i>	AD	Axonal	OMIM 606983	
<i>DHTKD1</i>	AD	Axonal	OMIM 614984	CMT2Q
<i>DNAJB2</i>	AR	Axonal	Frasquet et al [2016] , Lupo et al [2016]	DSMA5
<i>DNMT1</i>	AD	Axonal	DNMT1-Related Dementia, Deafness, and Sensory Neuropathy	DMNT1
<i>DNM2</i>	AD	Intermedio	OMIM 606482	CMT2M DI-CMTB
<i>DRP2</i>	XL	Intermedio	OMIM 300052	
<i>DYNC1H1</i>	AD	Axonal	OMIM 600112	CMT2O
<i>EGR2</i>	AD	Desmielinizante	OMIM 129010	CMT1D
	AR	Desmielinizante		CMT4E

Gen	Herencia	Fenotipo/Tipo de neuropatía	GeneReview / OMIM / Referencia	Otros nombres
<i>FGD4</i>	AR	Desmielinizante	OMIM 609311	CMT4H
<i>FIG4</i>	AR	Desmielinizante	OMIM 611228	CMT4J
<i>GARS1</i>	AD	Axonal	GARS1-Associated Axonal Neuropathy	CMT2D dHMN5A
<i>GNB4</i>	AD	Intermedio	OMIM 610863	DI-CMTF
<i>HARS1</i>	AD	Axonal/ desmielinizante	OMIM 142810	CMT2W
<i>HSPB1</i>	AD	Axonal	OMIM 602195	CMT2F dHMN2B
<i>HSPB3</i>	AD	-	OMIM 604624	dHMN2C
<i>HSPB8</i>	AD	Axonal	OMIM 608014	CMT2L dHMN2A
<i>IGHMBP2</i>	AR	Axonal	OMIM 600502	CMT2S DSMA1
<i>INF2</i>	AD	Intermedio	OMIM 610982	
<i>KIF1B</i>	AD	Axonal	OMIM 605995	CMT2A1
<i>KIF5A</i>	AD	Axonal	OMIM 602821	
<i>LITAF</i>	AD	Desmielinizante	OMIM 603795	CMT1C
<i>LMNA</i>	AR	Axonal	OMIM 150330	CMT2B1
<i>LRSAM1</i>	AD	Axonal	OMIM 610933	CMT2G
	AR			CMT2P

Gen	Herencia	Fenotipo/Tipo de neuropatía	GeneReview / OMIM / Referencia	Otros nombres
<i>MARS1</i>	AD	Axonal	OMIM 156560	CMT2U
<i>MCM3AP</i>	AR	Axonal/ desmielinizante	OMIM 603294	
<i>MME</i>	AR AD	Axonal	OMIM 120520	CMT2T
<i>MORC2</i>	AD	Axonal	OMIM 616661	CMT2Z
<i>MPV17</i>	AR	Axonal	OMIM 137960	
<i>MPZ</i>	AD	Axonal/ desmielinizante /intermedio	OMIM 118200	CMT1B CMT2I/J DI-CMTD
<i>MTMR2</i>	AR	Desmielinizante	OMIM 603557	CMT4B1
<i>NAGLU</i>	AD	Axonal	OMIM 609701	CMT2V
<i>NDRG1</i>	AR	Desmielinizante	OMIM 605262	CMT4D
<i>NEFH</i>	AD	Axonal	OMIM 162230	
<i>NEFL</i>	AD, AR	Axonal/ desmielinizante	OMIM 162280	CMT1F/2 E
<i>PDK3</i>	XL	Axonal	OMIM 300906	CMTX6
<i>PLEKHG5</i>	AR	Intermedio	OMIM 611101	DSMA4
<i>PMP2</i>	AD	Desmielinizante	OMIM 618279	CMT1G
<i>PNKP</i>	AR	Axonal	OMIM 605610	CMT2B2

Gen	Herencia	Fenotipo/Tipo de neuropatía	GeneReview / OMIM / Referencia	Otros nombres
<i>PRPS1</i>	XL	-	Charcot-Marie-Tooth Neuropathy X Type 5	CMTX5
<i>PRX</i>	AR	Axonal	OMIM 605725	CMT4F
<i>PTRH2</i>	AR	-	OMIM 608625	
<i>RAB7A</i>	AD	Axonal	OMIM 602298	CMT2B
<i>SBF1</i>	AR	Axonal	OMIM 603560	CMT4B3
<i>SBF2</i>	AR	Desmielinizante	OMIM 607697	CMT4B2
<i>SCO2</i>	AR	Axonal	Rebelo et al [2018]	
<i>SETX</i>	AD	Axonal	OMIM 608465	FALS
<i>SIGMAR1</i>	AR	Axonal	OMIM 601978	
<i>SGPL1</i>	AR	Axonal	OMIM 603729	
<i>SPG11</i>	AR	Axonal	OMIM 610844	CMT2X ALS5
<i>SPTLC1</i>	AD	Axonal	OMIM 605712	HSAN1A
<i>TRIM2</i>	AR	Axonal	OMIM 614141	CMT2R
<i>TRPV4</i>	AD	Axonal	TRPV4-Associated Disorders	CMT2C
<i>VCP</i>	AD	Axonal	Inclusion Body Myopathy with Paget Disease of Bone and/or Frontotemporal Dementia	CMT2Y
<i>WARS</i>	AD	Axonal	OMIM 191050	dHMN9
<i>YARS1</i>	AD	Intermedio	OMIM 603623	DI-CMTC

Gen	Herencia	Fenotipo/Tipo de neuropatía	GeneReview / OMIM / Referencia	Otros nombres
Unknown	XL	Desmielinizante	OMIM 302802	CMTX3

Tabla 1: Genes relacionados con las neuropatías CMT. Modificado de Bird TD. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. 1998 Sep 28 [Updated 2020 May 14]

5. CONCLUSIONES Y VISIÓN DE FUTURO

A lo largo de este trabajo se ha puesto de manifiesto el impacto que la aplicación de nuevas técnicas y métodos en investigación han contribuido a grandes avances, redefiniendo en algunos casos el panorama científico y las implicaciones que esto conlleva. Decir simplemente que es recomendable invertir en las nuevas herramientas existentes de análisis genómico como son las NGS, GWAS y demás es quedarse corto. Debe ser imperativo para la comunidad científica y los sistemas de salud invertir los recursos necesarios en infraestructuras, especialistas y aparatos para que se pueda masificar la utilización de NGS. Esto podría traducirse en un gran impulso a las investigaciones sobre el comportamiento genético, su expresión e interrelación a escala funcional con el resto del organismo, y otros aspectos menos centrados en el ámbito genético y más con el origen de determinadas patologías como se ha descrito en este trabajo.

El uso de NGS como método diagnóstico es claramente ventajoso. Además de identificar con relativa facilidad la causa que produce la patología, es un método para el que los pacientes y familias están dispuestos a pagar. Entender cómo una patología afecta a todos los niveles y el impacto que tiene en el organismo es el primer paso para estudiar posibles tratamientos o cuidados que funcionan mejor para los pacientes. En las enfermedades raras este hecho toma mucha más importancia, y unido a la mejora de diagnóstico que las propias NGS manifiestan se podría mejorar titánicamente la calidad de vida de los pacientes con enfermedades raras: podrían obtener un diagnóstico adecuado en relativamente poco tiempo, y gracias al

conocimiento de la patología, previamente estudiada mediante NGS, se le podría administrar el tratamiento óptimo.

Actualmente el principal cuello de botella del análisis genético de enfermedades raras mediante análisis de exomas o genomas no está en el precio o procesamiento de muestras, sino en el análisis bioinformático de la información. La toma de muestras está estandarizada mediante el uso de kits de extracción de ADN de saliva, que permite al médico e incluso el propio paciente o los padres de niños afectados tomar las muestras necesarias, que son fácilmente procesables hasta la purificación del ADN en protocolos de apenas 15 minutos. Posteriormente se puede subcontratar la secuenciación con alguna de las empresas especializadas nacionales o internacionales (como las empresas *Novogene* u *Otogenetics*) las cuales realizan por un precio muy bajo la secuenciación de nivel “clínico” con una profundidad de lectura en torno al 100-200X. Posteriormente una vez recibida la información tras aproximadamente 25 días, comienza la parte realmente importante y significativa para el diagnóstico; discernir entre el gran número de variantes polimórficas con respecto al genoma de referencia. Se realiza un filtrado de dichas variantes utilizando criterios como la frecuencia de las variantes en la población de referencia, eliminación de variantes sinónimas, y de aquellas para las cuales los algoritmos de predicción de alteraciones estructurales proteicas sean bajas. Esto da lugar a una lista “filtrada” que contiene una media de varios cientos de mutaciones potencialmente causales. Estas han de ser posteriormente clasificadas en función del nivel de conocimiento que se tiene de ellas en la literatura científica (variantes de significación clínica en las bases de datos del NCBI). O en la gravedad del impacto de la mutación en la traducción de la proteína, especialmente aquellas mutaciones que generan codones de parada prematuros. Es necesario igualmente la descripción de potenciales mutaciones recesivas combinadas en trans (una en cada cromosoma) que puedan producir un efecto deletéreo por combinación, ya que en este caso ambas copias del gen estarían defectuosas, aunque la mutación no sea la misma. Todo este proceso se ha visto afectado positivamente por el desarrollo de aplicaciones vía web que permiten el análisis masivo de estas mutaciones (por ejemplo, SNP NEXUS o MENDELMD). En general la tasa de éxito en el diagnóstico y clasificación de enfermedades raras supera otras estrategias más tradicionales como el análisis mediante secuenciación de genes candidatos

Tras haber revisado los aspectos generales y las características del CMT, se pone aún más de manifiesto este claro ejemplo de la utilidad para diagnosticar patologías o identificar las causas de estas mediante NGS. Gracias a este método, a lo largo de muchos años e investigaciones el número de genes conocidos que están vinculados al CMT asciende 80, y sin las NGS no se podría haber llegado a esta cantidad.

El diagnóstico es necesario para el paciente, pero también es importante para la familia, especialmente en casos como el del CMT en el que la enfermedad es hereditaria para poder estudiar las posibilidades de que otros miembros de la familia desarrollen la enfermedad genética.

En resumen, las nuevas técnicas de secuenciación están moldeando el panorama científico tal y como lo conocemos actualmente. Facilitar el acceso de las NGS en genómica y clínica se podría traducir en una mejor calidad de vida de los pacientes como mínimo, y en un impulso exponencial a la investigación tal y como la conocemos como máximo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., ... Craig Venter, J. (2000, marzo 24). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, Vol. 287, pp. 2185-2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016, diciembre 1). High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, Vol. 56, pp. 394-404. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0606-4>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), 236-238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Berciano, J., García, A., Gallardo, E., Peeters, K., Pelayo-Negro, A. L., Álvarez-Paradelo, S., ... Jordanova, A. (2017, agosto 1). Intermediate Charcot–Marie–Tooth disease: an electrophysiological reappraisal and systematic review. *Journal of Neurology*, Vol. 264, pp. 1655-1677. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8474-3>
- Bergoffen, J., Scherer, S. S., Wang, S., Oronzi Scott, M., Bone, L. J., Paul, D. L., ... Fischbeck, K. H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, 262(5142), 2039-2042. <https://doi.org/10.1126/science.8266101>
- Bird, T. D. (1993). Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. En *GeneReviews®*. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301532>
- Calvo, J., Funalot, B., Ouvrier, R. A., Lazaro, L., Toutain, A., De Mas, P., ... Magdelaine, C. (2009). Genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations. *Archives of Neurology*, 66(12), 1511-1516. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.284>
- Casasnovas Pons, C., Banchs, I., Cassereau, J., Gueguen, N., Chevrollier, A., Martínez-Matos, J. A., ... Volpini, V. (2010). Phenotypic spectrum of MFN2 mutations in the Spanish population. *Journal of Medical Genetics*, 47(4), 249-256. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.072488>
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2013). Genomics & Systems Biology. En *Molecular*

- Biology* (pp. 248-272). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378594-7.00009-3>
- Dewey, F. E., Pan, S., Wheeler, M. T., Quake, S. R., & Ashley, E. A. (2012). DNA sequencing clinical applications of new DNA sequencing technologies. *Circulation*, 125(7), 931-944. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972828>
- Di Resta, C., & Ferrari, M. (2018). Next Generation Sequencing: From Research Area to Clinical Practice. *EJIFCC*, 29(3), 215-220. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30479607>
- Di Resta, C., Galbiati, S., Carrera, P., & Ferrari, M. (2018). Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: Open challenges and new opportunities. *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 29(1), 4-14. Recuperado de [/pmc/articles/PMC5949614/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC5949614/?report=abstract)
- Dragojlovic, N., van Karnebeek, C. D. M., Ghani, A., Genereaux, D., Kim, E., Birch, P., ... Lynd, L. D. (2020). The cost trajectory of the diagnostic care pathway for children with suspected genetic disorders. *Genetics in Medicine*, 22(2), 292-300. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0635-6>
- Federación española de enfermedades raras (FEDER); Centro de Referencia Estatal de Enfermedades Raras (CREER). (2018). *Estudio sobre situación de Necesidades Sociosanitarias de las personas con Enfermedades Raras en España. ESTUDIO ENSERio. Datos 2016-2017*. Recuperado de [https://obser.enfermedades-raras.org/wp-content/uploads/2018/12/FINAL-ENSERio_Estudio-sobre-situacion de-Necesidades-Sociosanitarias-Personas-con-Enfermedades-Raras-en-Espana.pdf](https://obser.enfermedades-raras.org/wp-content/uploads/2018/12/FINAL-ENSERio_Estudio-sobre-situacion-de-Necesidades-Sociosanitarias-Personas-con-Enfermedades-Raras-en-Espana.pdf)
- Garrido-Cardenas, J. A., Garcia-Maroto, F., Alvarez-Bermejo, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2017, marzo 14). DNA sequencing sensors: An overview. *Sensors (Switzerland)*, Vol. 17. <https://doi.org/10.3390/s17030588>
- Gentile, F., Scarlino, S., Falzone, Y. M., Lunetta, C., Tremolizzo, L., Quattrini, A., & Riva, N. (2019, junio 25). The peripheral nervous system in amyotrophic lateral sclerosis: Opportunities for translational research. *Frontiers in Neuroscience*, Vol. 13, p. 601. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00601>

- Hayasaka, K., Himoro, M., Sato, W., Takada, G., Uyemura, K., Shimizu, N., ... Chance, P. F. (1993). Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nature Genetics*, 5(1), 31-34. <https://doi.org/10.1038/ng0993-31>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016, enero 1). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, Vol. 107, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Jani-Acsadi, A., Ounpuu, S., Pierz, K., & Acsadi, G. (2015, junio 1). Pediatric Charcot-Marie-Tooth Disease. *Pediatric Clinics of North America*, Vol. 62, pp. 767-786. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.03.012>
- Joo, I. S., Ki, C. S., Joo, S. Y., Huh, K., & Kim, J. W. (2004). A novel point mutation in PMP22 gene associated with a familial case of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with sensorineural deafness. *Neuromuscular Disorders*, 14(5), 325-328. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.02.009>
- Khromykh, A., & Solomon, B. D. (2015, septiembre 23). The Benefits of Whole-Genome Sequencing Now and in the Future. *Molecular Syndromology*, Vol. 6, pp. 108-109. <https://doi.org/10.1159/000438732>
- Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K., & Mardis, E. R. (2013, septiembre 26). XThe next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*, Vol. 155, p. 27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006>
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Lemke, G., & Axel, R. (1985). Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell*, 40(3), 501-508. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90198-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90198-9)
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Mutations: Types and Causes*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21578/>
- Ludwig, P. E., & Varacallo, M. (2019). Neuroanatomy, Neurons. En *StatPearls*.

Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28723006>

- Magy, L., Mathis, S., Le Masson, G., Goizet, C., Tazir, M., & Vallat, J.-M. (2018). Updating the classification of inherited neuropathies. *Neurology*, 90(10), e870-e876. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000005074>
- Marian, A. J. (2014). Sequencing your genome: what does it mean? *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, Vol. 10, pp. 3-6. <https://doi.org/10.14797/mdcj-10-1-3>
- Marshall, D. A., MacDonald, K. V., Heidenreich, S., Hartley, T., Bernier, F. P., Gillespie, M. K., ... Boycott, K. M. (2019). The value of diagnostic testing for parents of children with rare genetic diseases. *Genetics in Medicine*, 21(12), 2798-2806. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0583-1>
- Martyn, C. N., & Hughes, R. A. C. (1997, abril 1). Epidemiology of peripheral neuropathy. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, Vol. 62, pp. 310-318. <https://doi.org/10.1136/jnnp.62.4.310>
- Mastaglia, F. L., Nowak, K. J., Stell, R., Phillips, B. A., Edmondston, J. E., Dorosz, S. M., ... Laing, N. G. (1999). Novel mutation in the myelin protein zero gene in a family with intermediate hereditary motor and sensory neuropathy. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 67(2), 174-179. <https://doi.org/10.1136/jnnp.67.2.174>
- McCombie, W. R., McPherson, J. D., & Mardis, E. R. (2019). Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036798>
- Morena, J., Gupta, A., & Hoyle, J. C. (2019). Charcot-Marie-Tooth: From Molecules to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3419. <https://doi.org/10.3390/ijms20143419>
- Pareyson, D., Saveri, P., & Pisciotta, C. (2017, octubre 1). New developments in Charcot-Marie-Tooth neuropathy and related diseases. *Current Opinion in Neurology*, Vol. 30, pp. 471-480. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000474>
- Pham-dinh, D., Fourbil, Y., Blanquet, F., Matt  l, M. G., Roeckel, N., Latour, P., ...

- Dautigny, A. (1993). The major peripheral myelin protein zero gene: Structure and localization in the cluster of Fcγ receptor genes on human chromosome 1q21.3 - q23. *Human Molecular Genetics*, 2(12), 2051-2054. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.12.2051>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2001). *Neural Systems*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11061/>
- Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*, 16(1), 4-10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
- Raine, C. S. (1999). *Characteristics of the Neuron*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28209/>
- Ramchandren, S. (2017, octubre 1). Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Genetic Polyneuropathies. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, Vol. 23, pp. 1360-1377. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000529>
- Robert, F., & Pelletier, J. (2018). Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Frontiers in Genetics*, 9, 507. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00507>
- Santel, A., & Fuller, M. T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science*, 114(5).
- Sawyer, S. L., Hartley, T., Dymont, D. A., Beaulieu, C. L., Schwartzentruber, J., Smith, A., ... Boycott, K. M. (2016, marzo 1). Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: Time to address gaps in care. *Clinical Genetics*, Vol. 89, pp. 275-284. <https://doi.org/10.1111/cge.12654>
- Senderek, J., Hermanns, B., Lehmann, U., Bergmann, C., Marx, G., Kabus, C., ... Schröder, J. M. (2000). Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2 and P0 Point Mutations: Two Novel Amino Acid Substitutions (Asp61Gly; Tyr119Cys) and a Possible "Hotspot" on Thr124Met. *Brain Pathology*, 10(2), 235-248. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00257.x>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), e59.

<https://doi.org/10.1002/cpmb.59>

- Smith, H. S., Swint, J. M., Lalani, S. R., Yamal, J. M., de Oliveira Otto, M. C., Castellanos, S., ... Russell, H. V. (2019, enero 1). Clinical Application of Genome and Exome Sequencing as a Diagnostic Tool for Pediatric Patients: a Scoping Review of the Literature. *Genetics in Medicine*, Vol. 21, pp. 3-16. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0024-6>
- Snipes, G. J., Suter, U., Welcher, A. A., & Shooter, E. M. (1992). Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP- 22/SR13). *Journal of Cell Biology*, 117(1), 225-238. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.1.225>
- Thau, L., Reddy, V., & Singh, P. (1943). Anatomy of Central Nervous System. *BMJ*, 1(4293), 478-478. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4293.478>
- Valentijn, L. J., Bolhuis, P. A., Zorn, I., Hoogendijk, J. E., van den Bosch, N., Hensels, G. W., ... Baas, F. (1992). The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nature Genetics*, 1(3), 166-170. <https://doi.org/10.1038/ng0692-166>