

Diseño de microsondas mediante hibridación virtual para el estudio de variantes en los sitios REP-CMT1A

Edgar Hernández-Zamora,^{a*} María de la Luz Arenas-Sordo^a y Rogelio Maldonado-Rodríguez^b

^aServicio de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación y ^bLaboratorio de Tecnología del DNA, Escuela Nacional de ciencias Biológicas, IPN, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 30 de octubre de 2007

Acceptado: 9 de noviembre de 2007

RESUMEN

Antecedentes: El gen PMP22 se encuentra duplicado en pacientes con Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT1A); se ha descrito que el origen de la duplicación es el intercambio desigual de las cromátidas durante la meiosis entre dos regiones de 24 kb denominadas sitios REP-CMT1A, encontrándose un REP proximal y un REP distal, los cuales tienen una homología de 98%. Dentro de cada uno de estos sitios existen zonas denominadas puntos calientes de mutación (hot spot), donde se presenta el mayor número de variantes y mutaciones que pudieran dar origen al intercambio desigual. El objetivo de este trabajo fue diseñar un conjunto de microsondas para elaborar un microarreglo con el cual pueda detectarse la presencia de variantes y puntos de mutación en los sitios REP-proximal y REP-distal CMT1A. **Material y métodos** A partir de las secuencias informadas de los REP distal y proximal, se delimitaron los sitios hot spot dentro de las regiones proximal y distal. Estas secuencias se alinearon, se empalmaron y se detectaron 12 zonas de diferencia secuencial. **Resultados y conclusiones.** Se diseñaron y analizaron 24 microsondas mediante el programa Genosensor Probe Designer. Las sondas podrán ser sintetizadas y utilizadas en un microarreglo que permita encontrar variaciones, puntos de mutación, y facilitar el diagnóstico de pacientes con CMT1A.

Palabras clave:

CMT1A, genosensor, microarreglo, microsondas, REP

SUMMARY

Background: Gene PMP22 is duplicated in patients with CMT1A. Duplication is due to an unequal chromatid interchange during meiosis that takes place between two 24 Kb regions named REP-CMT1A proximal and distal sites. Homology is approximately 98%. Within each one of the sites we find zones termed hot spots where a greater number of variants and mutations could give origin to an unequal interchange. The aim of this study was to design a set of probes to create a microarray that could detect the presence of variants and mutation points in distal and proximal REP sites among patients with CMT1A.

Material and methods. With reported sequences of distal and proximal REPs, we determined hot spot sites within proximal and distal regions. These sequences were aligned and matched, hence 12 zones were detected.

Results and conclusions. Twenty four probes were designed and analyzed using the Genosensor Probe Designer program. Probes could be synthesized and used in a microarray that is able to find variations and mutation points and facilitates diagnosis of patients with CMT1A.

Key words:

CMT1A, DNA arrays, DNA microarrays, hot spot, molecular diagnosis, REP

Introducción

El empleo de sondas de hibridación de ácidos nucleicos fue desarrollado por Edward M. Southern en 1975 para la detección de ADN (*Southern blot*) y posteriormente se aplicó a la detección de ARN (*Northern blot*); ambas técnicas emplean secuencias específicas (sondas) complementarias a la molécula de ácido nucleico a identificar. Es decir, utilizan la hibridación de ácidos nucleicos para la detección de las moléculas buscadas.¹⁻⁴

La tecnología para la detección de mutaciones que se ha descrito como Genosensor, sensor, micromatrices, microarreglos, *microarray* o biochips, consiste en utilizar un conjunto de sondas marcadas inmovilizadas en un soporte sólido (microson-

das) que hibridan con la totalidad de un gen o fragmento de DNA de cadena sencilla como blanco. La aparición de señales de hibridación en una microsonda permite determinar con precisión la posición donde se localiza la mutación (Figura 1).^{5,6} Las nuevas tecnologías permiten comprender la función de los sistemas biológicos y observar el comportamiento de genomas completos bajo condiciones específicas, así como investigar una o varias mutaciones desconocidas de manera simultánea en una reacción de hibridación. Este tipo de estudios tendrán un gran impacto en la salud pública al ofrecer nuevos marcadores de padecimientos que permitan identificar problemas de salud con mayor exactitud y de manera más temprana.⁷

La neuropatía periférica de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es la enfermedad hereditaria más común del sistema nervio-

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Edgar Hernández-Zamora. Instituto Nacional de Rehabilitación. Av. México-Xochimilco 289, Arenal de Guadalupe, Tlalpan 14389 México D.F., México. Tel.: (55) 5999 1000, extensiones 19405 y 19402. Fax: (55) 5645 5603. Correo electrónico: edghernandez@inr.gob.mx; edgarhz1969@yahoo.com.mx

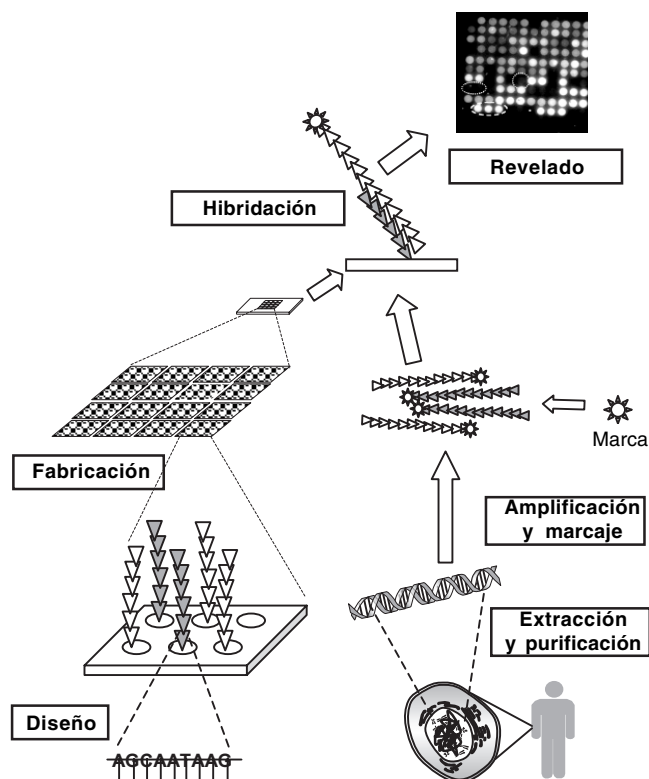


Figura 1. Procedimiento general para la elaboración y prueba de un microarreglo.

so periférico humano (un afectado por cada 2500 individuos). Sus principales características fenotípicas son atrofia muscular peronea, y secundaria a ésta la presencia de pie cavo, así como debilidad de varios grupos musculares.⁸⁻¹⁰ El subtipo más frecuente es el 1A (CMT1A, OMIM 118220) con una transmisión autosómica dominante, la cual en aproximadamente 70% de los casos presenta una duplicación en tándem de un fragmento de alrededor de 1.5 Mb de DNA en el locus 17p11.2-p12, donde se encuentra el gen codificante de la proteína PMP22.¹¹⁻¹⁴ El origen de la duplicación se atribuye a un intercambio desigual de las cromátidas durante la meiosis, entrecruzamiento desigual que ocurre entre dos regiones de 24 kb que limitan al gen PMP22 denominadas sitios REP, encontrándose un REP proximal y un REP distal, los cuales tienen una homología de 98%. Dentro de cada uno de estos REP existen zonas denominadas puntos calientes de mutación (*hot spot*) (de casi 1.4 kb) (Figura 2), donde se presenta el mayor número de variantes y mutaciones que pudieran dar origen al intercambio desigual precisamente por presentar pequeñas variaciones secuenciales, las cuales podrían favorecer el intercambio con la otra secuencia homóloga y no con la correspondiente.¹⁵

El objetivo de este trabajo fue diseñar 12 microsondas complementarias mediante hibridación virtual, para elaborar un microarreglo con el cual pueda detectarse la presencia de variantes y puntos de mutación en los sitios REP proximal y REP distal de PMP22. Por otro lado, podría detectarse la

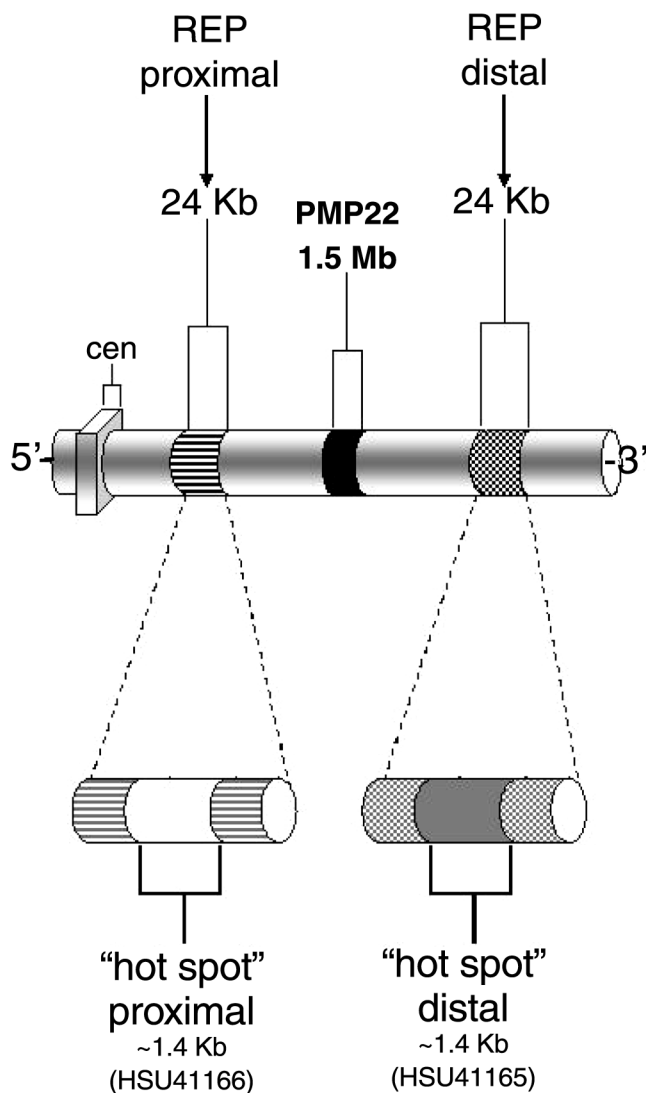


Figura 2. Organización del gen PMP22 y los sitios REP-CMT1A proximal y distal del genoma humano.

neuropatía hereditaria con riesgo a parálisis por presión (HNPP, OMIM 162501) en pacientes heterocigotos por delección para el gen PMP22, debido a que el origen de la misma es similar al de la duplicación de PMP22.

Material y métodos

Obtención de las secuencias hot spot REP-CMT1A con Clustal-X

A partir de las secuencias reportadas en el GenBank de los *hot spot* distal (HSU41165) y proximal (HSU41166), se obtuvieron de manera teórica los productos de amplificación mediante las secuencias de los iniciadores señalados por Han y colaboradores,¹⁵ quienes realizaron una reacción de

PCR anidada para amplificar las zonas donde se encuentran los puntos de recombinación desigual para los sitios REP-CMT1A. Todas las secuencias utilizadas fueron grabadas en formato FASTA para su análisis en los diferentes programas

empleados. Utilizando el programa Clustal-X versión 1.80,¹⁶ se alinearon los iniciadores y se obtuvieron las secuencias de los productos teóricos de las dos reacciones de amplificación.

Cuadro I. Lista de secuencias de prueba y secuencias blanco, con ΔG° calculado en kcal/mol

	Núm.	Sonda	ΔG°	Posición	Blanco	ΔG°
Sondas distales vs. secuencia distal (5' → 3')	1:	ACAAGTTTA:	-9.19:	1393:	TGTTCAAAT:	-9.19
	2:	CAATAGGAT:	-9.21:	1286:	GTTATCCTA:	-9.21
	3:	AAAAACCTT:	-9.56:	1244:	TTTTTGGAA:	-9.56
	4:	AGCAATAAG:	-9.71:	1195:	TCGTTATTC:	-9.71
	5:	GGCTAGAGT:	-11.24:	1019:	CCGATCTCA:	-11.24
	6:	ATGTTTAAA:	-8.35:	717:	TACAAATTT:	-8.35
	7:	AGCGTGTGA:	-12.77:	640:	TCGCACACT:	-12.77
	8:	GCTTTTTTA:	-9.10:	452:	CGAAAAAAT:	-9.10
	9:	ATTTCAAAG:	-8.91:	355:	TAAAGTTTC:	-8.91
	10:	TGCACTGGT:	-12.59:	237:	ACGTGACCA:	-12.59
	11:	AACGACTCT:	-11.21:	186:	TTGCTGAGA:	-11.21
	12:	AGTTAAAGG:	-9.42:	14:	TCAATTTCC:	-9.42
Sondas distales vs. secuencia proximal (5' → 3')	1:	ACAAGTTTA:	-9.19:	1230:	TGTTCAAAT:	-9.19
	2:	CAATAGGAT:	-9.21:	1282:	GTTATCTAA:	-5.19
	3:	AAAAACCTT:	-9.56:	1247:	TTTTGGGAA:	-7.52
	4:	AGCAATAAG:	-9.71:	1198:	TCGTCATTC:	-6.13
	5:	GGCTAGAGT:	-11.24:	1022:	CCGACCTCA:	-7.68
	6:	ATGTTTAAA:	-8.35:	397:	AACAAATTA:	-6.47
	7:	AGCGTGTGA:	-12.77:	815:	TCGTACACA:	-8.26
	8:	GCTTTTTTA:	-9.10:	455:	CGAAAAATC:	-7.52
	9:	ATTTCAAAG:	-8.91:	1182:	CTGAGTTTC:	-6.03
	10:	TGCACTGGT:	-12.59:	1084:	GTGTGACCA:	-8.90
	11:	AACGACTCT:	-11.21:	190:	TTGCCGAGA:	-7.17
	12:	AGTTAAAGG:	-9.42:	358:	AAAATTTCC:	-6.70
Sondas proximales vs. secuencia distal (5' → 3')	1:	ACAAATTTA:	-8.35:	1314:	TGTTTCGTT:	-4.89
	2:	CAATAGATT:	-8.37:	1281:	CCTATCTAA:	-5.92
	3:	AAAACCTT:	-10.40:	1112:	AATTGGGTC:	-6.12
	4:	AGCAGTAAG:	-10.55:	1195:	TCGTTATTC:	-7.03
	5:	GGCTGGAGT:	-12.67:	1019:	CCGATCTCA:	-9.28
	6:	ATGTGTAAG:	-9.24:	809:	TACACACCG:	-6.66
	7:	AGTGTGTGA:	-11.25:	640:	TCGCACACT:	-9.46
	8:	GCTTTTTAG:	-9.38:	452:	CGAAAAAAT:	-7.52
	9:	ATTTTAAAG:	-7.74:	484:	TAAAATTTT:	-6.46
	10:	TGCATTGGT:	-11.75:	237:	ACGTGACCA:	-9.07
	11:	AACGGCTCT:	-12.55:	186:	TTGCTGAGA:	-8.97
	12:	AGTTAAATA:	-7.76:	13:	TCAATTTCCC:	-6.30
Sondas proximales vs. secuencia proximal (5' → 3')	1:	ACAAATTTA:	-8.35:	1389:	TGTTTAAAT:	-8.35
	2:	CAATAGATT:	-8.37:	1282:	GTTATCTAA:	-8.37
	3:	AAAACCTT:	-10.40:	1247:	TTTTGGGAA:	-10.40
	4:	AGCAGTAAG:	-10.55:	1198:	TCGTCATTC:	-10.55
	5:	GGCTGGAGT:	-12.67:	1022:	CCGACCTCA:	-12.67
	6:	ATGTGTAAG:	-9.24:	720:	TACACATTT:	-9.24
	7:	AGTGAGTGA:	-10.94:	643:	TCACTCACT:	-10.94
	8:	GCTTTTTAG:	-9.38:	455:	CGAAAAATC:	-9.38
	9:	ATTTTAAAG:	-7.74:	359:	TAAAATTTT:	-7.74
	10:	TGCATTGGT:	-11.75:	241:	ACGTAACCA:	-11.75
	11:	AACGGCTCT:	-12.55:	190:	TTGCCGAGA:	-12.55
	12:	AGTTAAATA:	-7.76:	17:	TCAATTTATT:	-7.76

Hibridación virtual

Una vez obtenidas las secuencias de los *hot spot* proximal y distal (posición 2401 a 3808), se alinearon, se empalmaron y se detectaron zonas de diferencia secuencial, utilizando el programa Genosensor Probe Designer (GPD).¹⁷ A partir de las zonas de diferencia entre ambas secuencias, se realizó el diseño y análisis, mediante la determinación de la energía libre de Gibbs (ΔG°), de 24 microsondas complementarias de nueve bases cada una, 12 correspondientes a las regiones distales y 12 a las zonas proximales, utilizando el programa GDP.

Resultados

En el cuadro I se presentan las secuencias de las sondas propuestas correspondientes al *hot spot* distal y al *hot spot* proximal. Además de los valores de ΔG° para los sitios blanco de cada sonda, tanto en región distal como en la región proximal. Se retan sondas distales y proximales, con *hot spot* proximal y distal.

Las gráficas A y B de la figura 3 muestran los valores absolutos de ΔG° , en las que se pueden observar diferencias significativas ($p=0.00001$) entre estos valores cuando se alinearon con las secuencias distal y proximal, excepto en la primera sonda distal en el que podemos observar que no hay diferencia entre la unión con la secuencia distal y la proximal, debido a que es la misma secuencia blanco la cual se integró como control del análisis.

La figura 4 muestra la representación de los sitios donde se alinean las sondas, la lista de las 12 secuencias proximales y las 12 distales, diseñadas y sugeridas para su síntesis, así como un esquema que representa la posición de cada sonda en un microarreglo.

Discusión

El genoma humano presenta una gran variación estructural, con una amplia gama de deleciones, duplicaciones e inversiones, que modifican la arquitectura genómica, la cual es muy importante en el origen de diversas enfermedades, particularmente en las que están involucradas con procesos de recombinación desigual, que condicionan duplicación o deleción génica tales como CMT1A, HNPP, síndrome de Smith-Magenis (SMS, OMIM 182290),¹⁸ síndrome velocardiofacial (VCFS, OMIM 192430), síndrome de DiGeorge (DGS, OMIM 188400),¹⁹ síndrome de Sotos (SS, OMIM 177550),^{20,21} entre muchos otros, clasificados como desórdenes genómicos. Los microarreglos y las microsondas permiten comprender los eventos de recombinación desigual que generan rearrreglos erróneos o nuevos, los cuales aún no son totalmente comprendidos y están asociados al origen de estas duplicaciones.^{15,22}

En la literatura se ha descrito que en los sitios *hot spot* REP-CMT1A existen regiones hipervariables, elementos repetidos como secuencias *Alu* y elementos LINE, elementos tipo retrotransposones, STR y mutaciones *de novo*, los cua-

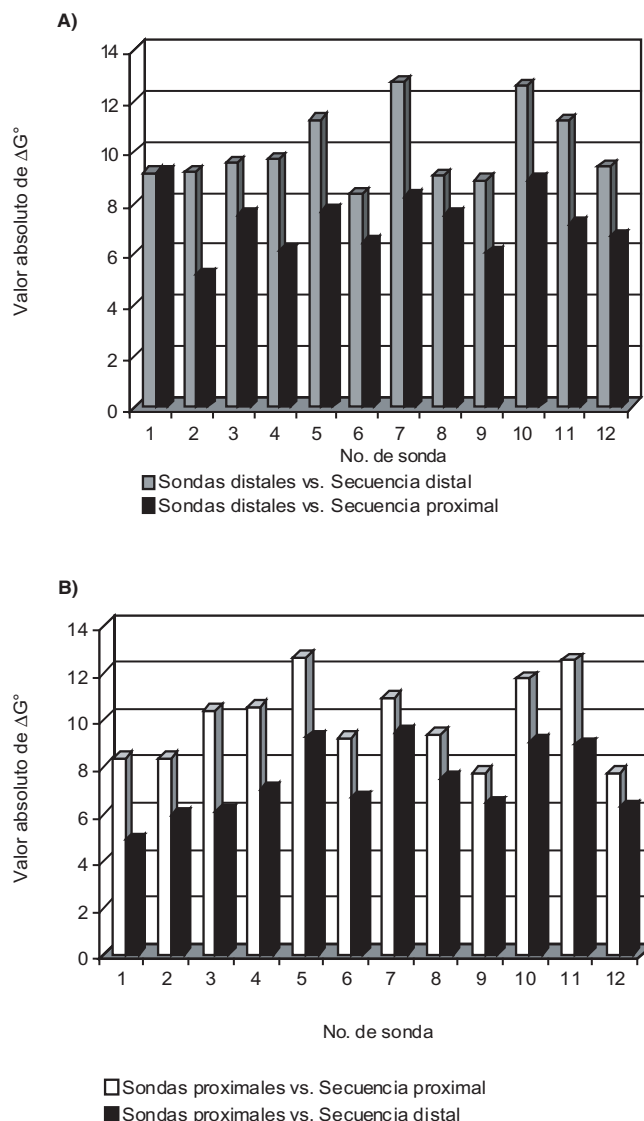


Figura 3. Valor absoluto de ΔG° . A) Estabilidad de sondas distales ($p=0.00001$). B) Estabilidad de sondas proximales ($p=0.00001$).

les tienen un origen evolutivo y podrían condicionar el intercambio desigual que está relacionado con la duplicación o deleción del gen PMP22.^{15,21-26}

Existen diferentes estrategias para la producción de microarreglos, desde las más simples donde se emplean soportes con portaobjetos y marcaje radiactivo o fluorescente, hasta las que ofrecen comercialmente diferentes empresas (Figura 1). Sin embargo, uno de los puntos más importantes dentro de la tecnología de microarreglos es precisamente el diseño de las sondas, debido a que éste es particular de cada grupo de estudio. Por ello, en este trabajo se diseñaron 24 microsondas complementarias de nueve bases cada una, 12

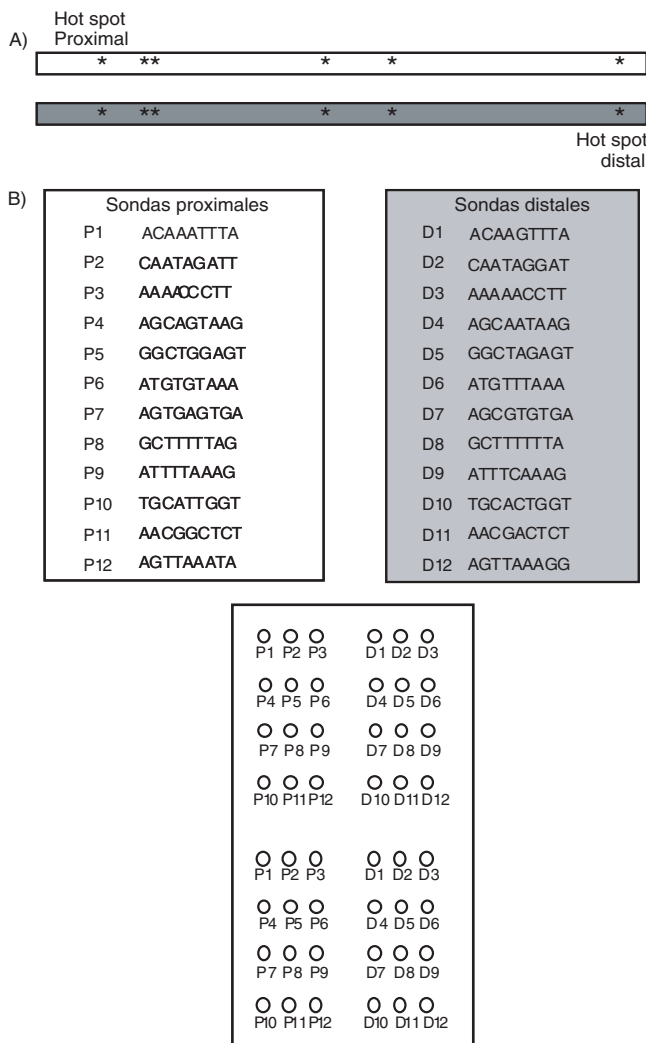


Figura 4. A) Los * representan los sitios de alineación en los sitios *hot spot* de las secuencias sugeridas para las microsondas. B) Diseño de distribución de las sondas en un soporte de vidrio.

correspondientes a las regiones distales (D1 a D12) y 12 a las zonas proximales (P1 a P12) de los *hot spot* de los REP-CMT1A. En la figura 4 se propone el orden en que deberán ser colocadas las microsondas en el microsensor. Esperaríamos encontrar que en los controles negativos todas las sondas hibriden en los sitios esperados, y que en los pacientes con CMT1A y controles positivos exista un mayor número de uniones inespecíficas o sitios donde no se unan las sondas; estos hechos nos indicarían si se trata de una secuencia normal o una mutante. Adicionalmente, la sonda D1 funcionará como un control interno, ya que en los controles negativos deberá unirse tanto con las secuencias distales como con las proximales (Figura 4). Todos los resultados encontrados deberán ser comprobados mediante secuenciación de estos sitios, y así detectar las diferencias secuenciales exactas donde las sondas se unan.

La aplicación de diversos marcadores que permiten detectar diferencias entre estas zonas ya ha sido descrita en la literatura.^{21,23,24} Por otro lado, recientemente se han publicado dos artículos en los se aplican microarreglos en el estudio de CMT1A. Gibson y colaboradores⁵ emplean sondas dirigidas al gen PMP22, únicamente para determinar si existe o no la duplicación del gen; Vigo y colaboradores²⁷ describen un conjunto de sondas que indican el funcionamiento de diferentes genes involucrados en la expresión de PMP22 en ratón, hecho que ofrece mucha información acerca de la enfermedad. Las microsondas diseñadas en ese trabajo nos darían información importante relacionada con el origen de la duplicación y los posibles mecanismos involucrados en la transmisión de ésta, aunadas a las propuestas por Lindsay y colaboradores²¹ y Vigo y colaboradores²⁷ al integrarlas en un microarreglo, como el que se propone, para el estudio de CMT1A. Más aún, es necesario continuar con el diseño de microsondas para confeccionar un microsensor o biochip que permita el diagnóstico de todas las variedades y subtipos de la neuropatía periférica Charcot-Marie-Tooth.

Por lo anterior, es fundamental realizar un estudio integral que incluya diferentes estrategias clínicas, electrofisiológicas y moleculares en este tipo de pacientes,²⁸⁻³¹ para establecer un diagnóstico correcto, ofrecer un consejo genético adecuado y buscar nuevas alternativas de tratamiento.³²

Las herramientas moleculares son muy diversas y es necesario buscar las alternativas rápidas, eficientes y sencillas que proporcionen más información y certeza en los resultados, así como una menor inversión económica. El uso de los microsensores es una propuesta con la que se ha demostrado que pueden estudiarse varios genes a la vez, ahorrando tiempo al paciente, al médico y al investigador.

Referencias

1. Southern EM. DNA microarrays history and overview. *Methods Mol Biol* 2001;170:1-15.
2. Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A. Determination of nucleic acid sequences homologous and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1541-1552.
3. Viikki J, Savontaus ML, Nikoskelainen EK. Genetic heterogeneity in Leber hereditary optic neuroretinopathy revealed by mitochondrial DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 1989;45:206-211.
4. Yoshikawa H, Nishimura T, Yanagihara T. Molecular pathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: abnormal expression of PMP-22. *Rinsho Shinkeigaku* 1995;35:1441-1443.
5. Gibbons B, Datta P, Wu Y, Chan A, Al Armour J. Microarray MAPH: accurate array-based detection of relative copy number in genomic DNA. *BMC Genomics* 2006;7:163-171.
6. Ducray F, Honnorat J, Lachuer J. DNA microarray technology: principles and applications to the study of neurological disorders. *Rev Neurol (Paris)* 2007;163:409-420.
7. Hernández-Romano J. Microarreglos y su impacto en la salud pública. *Enf Inf Microbiol* 2006;26:27-33.
8. Rodríguez-García PL, Rodríguez-Pupo L, Rodríguez-García D. Técnicas clínicas para el examen físico neurológico. I. Organización general, nervios craneales y nervios raquídeos periféricos. *Rev Neurol* 2004;39:757-766.
9. Rodríguez-García PL, Rodríguez-Pupo L, Rodríguez-García D. Técnicas clínicas para el examen físico neurológico. II. Funciones motora y refleja. *Rev Neurol* 2004;39:848-859.
10. Rodríguez-García PL, Rodríguez-Pupo L, Rodríguez-García D. Técnicas clínicas para el examen físico neurológico. III. Funciones sensoriales. *Rev Neurol* 2004;39:966-971.
11. Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, et al. Leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the

- 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:4382-4386.
12. **Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, et al.** Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J Biol Chem* 1994;269:25795-25808.
 13. **Harding AE.** From the syndrome of Charcot, Marie and Tooth to disorders of peripheral myelin proteins. *Brain* 1995;118:809-818.
 14. **D'Urso D, Schmalenbach C, Zoidl G, Prior R, Muller HW.** Studies on the effects of altered PMP22 expression during myelination *in vitro*. *J Neurosci Res* 1997;48:31-42.
 15. **Han LL, Keller MP, Navidi W, Chance PF, Arnheim N.** Unequal exchange at the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A recombination hot-spot is not elevated above the genome average rate. *Hum Mol Gen* 2000;9:1881-1889.
 16. **Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ.** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 1998;23:403-405.
 17. **Reyes-López MA, Méndez-Tenorio A, Maldonado-Rodríguez R, Doktycz MJ, Fleming JT, Beattie KL.** Fingerprinting of prokaryotic 16S rRNA genes using oligodeoxyribonucleotide microarrays and virtual hybridization. *Nucleic Acids Res* 2003;31:779-789.
 18. **Bi W, Yan J, Stankiewicz P, Park SS, Walz K, Boerkoel CF, et al.** Genes in refined Smith-Magenis Syndrome critical deletion interval on chromosome 17p11.2 and the syntenic region of the mouse. *Genome* 2007;12:713-728.
 19. **Paylor R, McIlwain KL, McAninch R, Nellis A, Yuva-Paylor LA, Baldini A, et al.** Mice deleted for the DiGeorge/velocardiofacial syndrome region show abnormal sensorimotor gating and learning and memory impairments. *Hum Mol Genet* 2001;10:2645-2650.
 20. **Baujat G, Cormier-Daire V.** Sotos syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:1750-1761.
 21. **Lindsay SJ, Khajavi M, Lupski JR, Hurler ME.** A chromosomal rearrangement hotspot can be identified from population genetic variation and is coincident with a hotspot for allelic recombination. *Am J Hum Genet* 2006;79:890-902.
 22. **Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD.** Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 2000;10:597-610.
 23. **Pentao L, Wise CA, Chinault AC, Patel PI, Lupski JR.** Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit. *Nat Genet* 1992;2:292-300.
 24. **Choi BO, Kim J, Lee KL, Yu JS, Hwang JH, Chung KW.** Rapid diagnosis of CMT1A duplications and HNPP deletions by multiplex microsatellite PCR. *Mol Cells* 2007;23:39-48.
 25. **Lopes J, Ravisé N, Vandenberghe A, Palau F, Ionasescu V, Mayer M, et al.** Fine mapping of de novo CMT1A and HNPP rearrangements within CMT1A-REPs evidences two distinct sex-dependent mechanisms and candidate sequences involved in recombination. *Hum Mol Genet* 1998;7:141-148.
 26. **Inoue K, Dewar K, Katsanis N, Reiter LT, Lander ES, Devon KL, et al.** The 1.4-Mb CMT1A duplication/HNPP deletion genomic region reveals unique genome architectural features and provides insights into the recent evolution of new genes. *Genome Res* 2001;11:1018-1033.
 27. **Vigo T, Nobbio L, Hummelen PV, Abbruzzese M, Mancardi G, Verpoorten N, et al.** Experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A: a cDNA microarrays analysis. *Mol Cell Neurosci* 2005;28:703-714.
 28. **Grandis M, Shy ME.** Current therapy for Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Treat Options Neurol* 2005;7:23-31.
 29. **Salamanca-Gómez F.** Avances en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. *Gac Med Mex* 2001;137:487-488.
 30. **Luciano CA.** Aspectos importantes en el diagnóstico y manejo de las neuropatías periféricas. *Rev Neurol* 1999;29:184-188.
 31. **Palau F, Cuesta A, Pedrola L.** Avances en la genética molecular de las neuropatías hereditarias. *Rev Neurol* 2002;35:246-253.
 32. **Kochanski A.** Charcot-Marie-Tooth disorders: past, today and tomorrow. *Neurol Neurochir Pol* 2006;40:327-335.