

II. OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS:

1. Identificar el defecto molecular en el gen de la miofosforilasa (PYGM) en una serie de 21 familias con individuos afectados de enfermedad de McArdle, demostrada mediante criterios clínicos y morfológicos.
2. Establecer la patogenicidad de las variantes nucleotídicas identificadas mediante criterios canónicos que incluyen: conservación filogenética, alteraciones estructurales de la proteína y ausencia de las variantes identificadas en largas series de individuos control.
3. Describir las características clínicas de la enfermedad intra e interfamiliares.
4. Establecer la existencia o no, de una posible correlación genotipo-fenotipo en la serie de pacientes genotipados.
5. Determinar las características del genotipo de la enfermedad en el contexto de la población de nuestro país mediante la identificación de mutaciones prevalentes y/o privadas de los individuos de nuestra serie.

OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- FAMILIAS Y PACIENTES ESTUDIADOS

3.1.1.- GRUPO DE PACIENTES DEL ESTUDIO

Se estudiaron un total de 35 pacientes (20 varones y 15 mujeres) pertenecientes a 21 familias diferentes, referidos para su valoración a nuestra Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Servicio de Neurología del Hospital General Universitari Vall d'Hebrón de Barcelona.

En cada una de las familias estudiamos el caso índice y aquellos miembros que dieron su consentimiento para ser explorados y, en su caso, someterse a pruebas diagnósticas complementarias. El número de pacientes afectos estudiados en cada una de las familias, así como el sexo, se detallan en la tabla siguiente:

FAMILIA Nº	TOTAL CASOS	VARONES	MUJERES
PYGM-01	4	0	4
PYGM-02	1	0	1
PYGM-03	1	1	0
PYGM-04	2	2	0
PYGM-05	2	1	1
PYGM-06	1	0	1
PYGM-07	5	3	2
PYGM-08	1	1	0
PYGM-09	2	1	1
PYGM-10	1	0	1
PYGM-11	1	1	0
PYGM-12	3	3	0
PYGM-13	1	0	1
PYGM-14	3	2	1
PYGM-15	1	1	0
PYGM-16	1	1	0
PYGM-17	1	0	1
PYGM-18	1	0	1
PYGM-19	1	1	0
PYGM-20	1	1	0
PYGM-21	1	1	0

3.1.2.- PEDIGRÍS DE LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

Cada una de las familias fué numerada del 1 al 21, precedida de la abreviatura PYGM (gen de la miofosforilasa). Los símbolos utilizados en el pedigrí fueron: cuadrados para los hombres y círculos para las mujeres. Los símbolos llenos (en negro) significan que el individuo está afecto clínicamente. Cuando hay varios miembros afectados en una misma familia, se señala al caso índice (probando) con una flecha.

Para su mejor identificación, cada uno de los individuos va rotulado con un número romano que se refiere a la generación a que pertenece dentro de la familia, seguido de un número arábigo que se refiere al orden cronológico de nacimiento. Ambos números van separados por el signo matemático de la división.

Los gemelos homo o dicigotos fueron expresados con un ángulo, con vértice en la línea que une ambos progenitores.

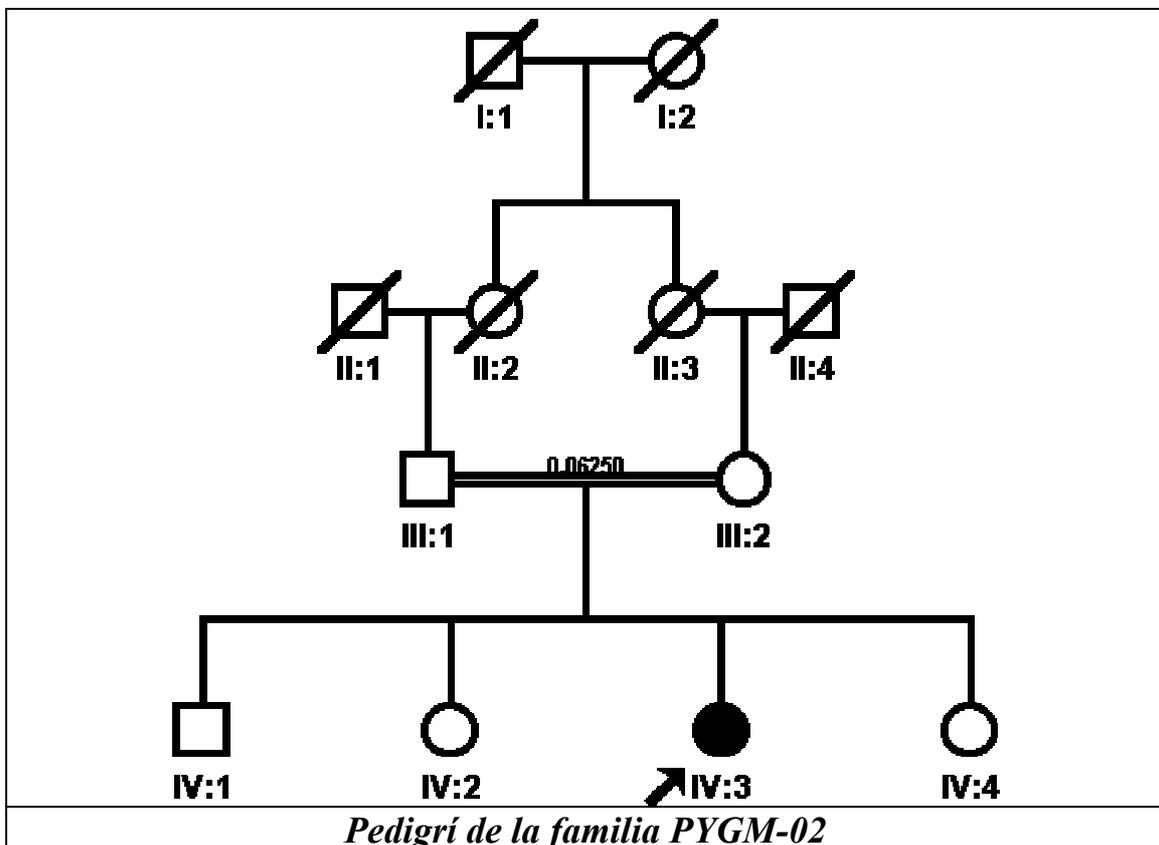
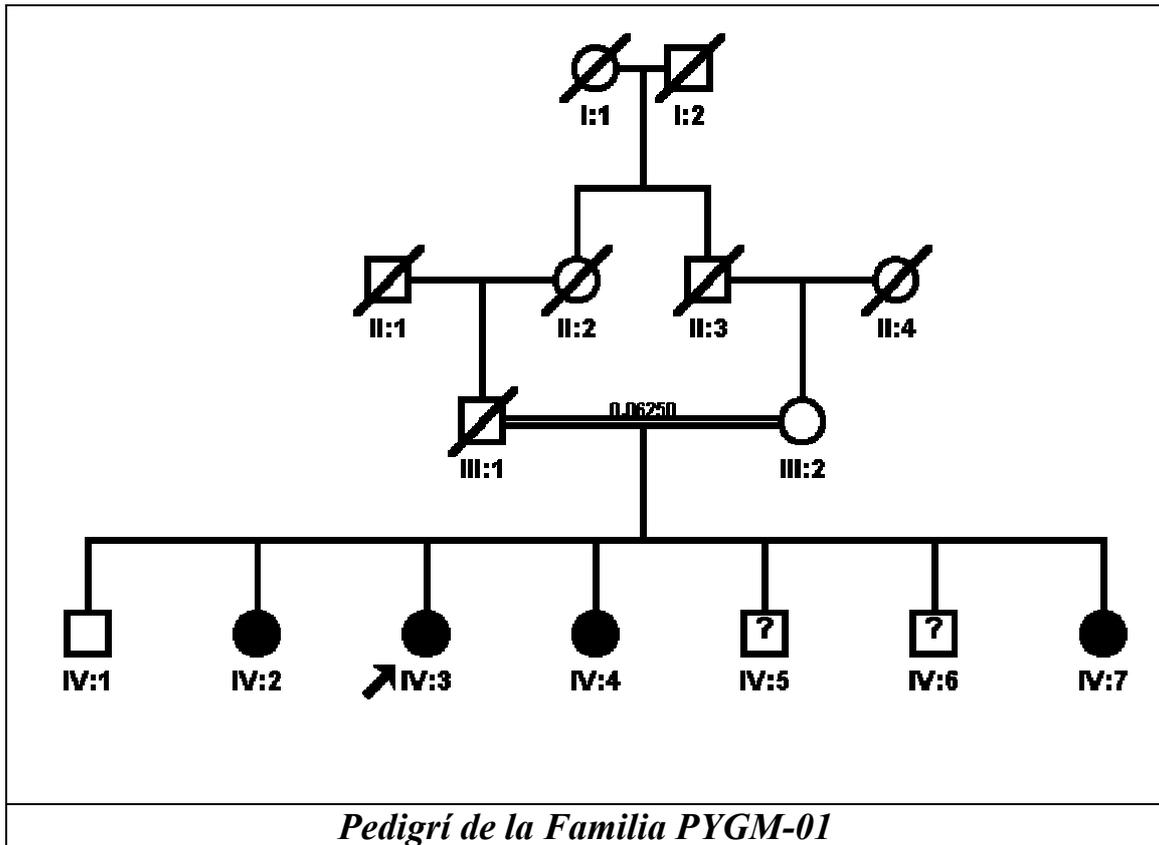
Se utilizó un raya cruzando al símbolo, para expresar que el individuo había fallecido.

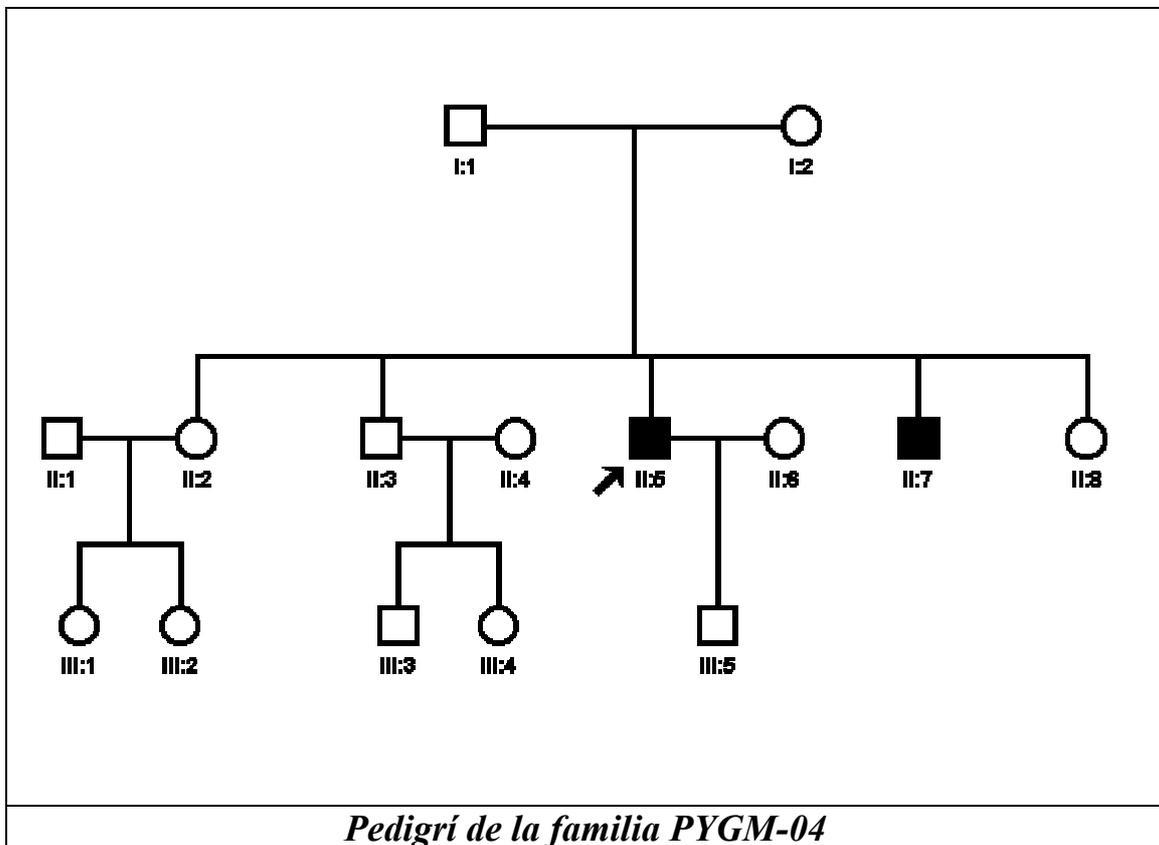
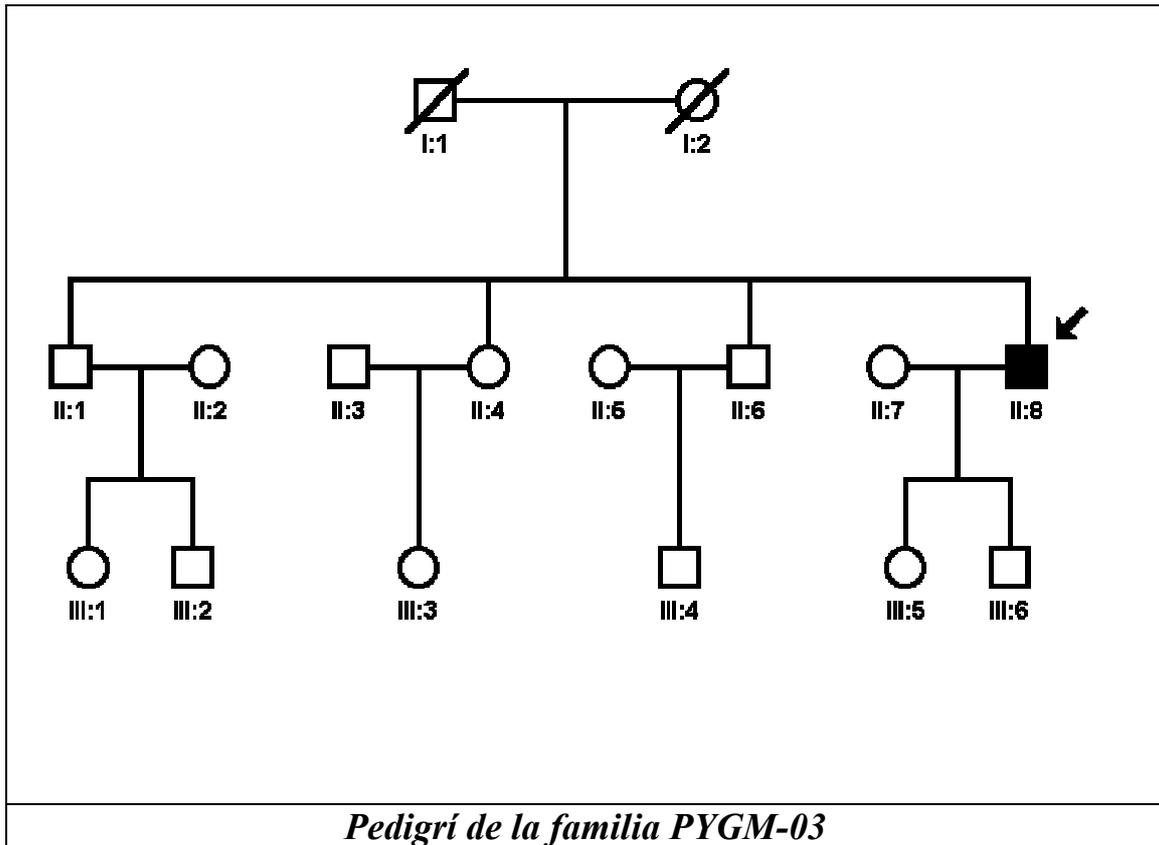
La consanguinidad se expresó mediante una línea doble que unía a ambos progenitores. Además, en la mayoría de pedigrís pudo detallarse el tipo de relación existente entre los miembros de las generaciones anteriores.

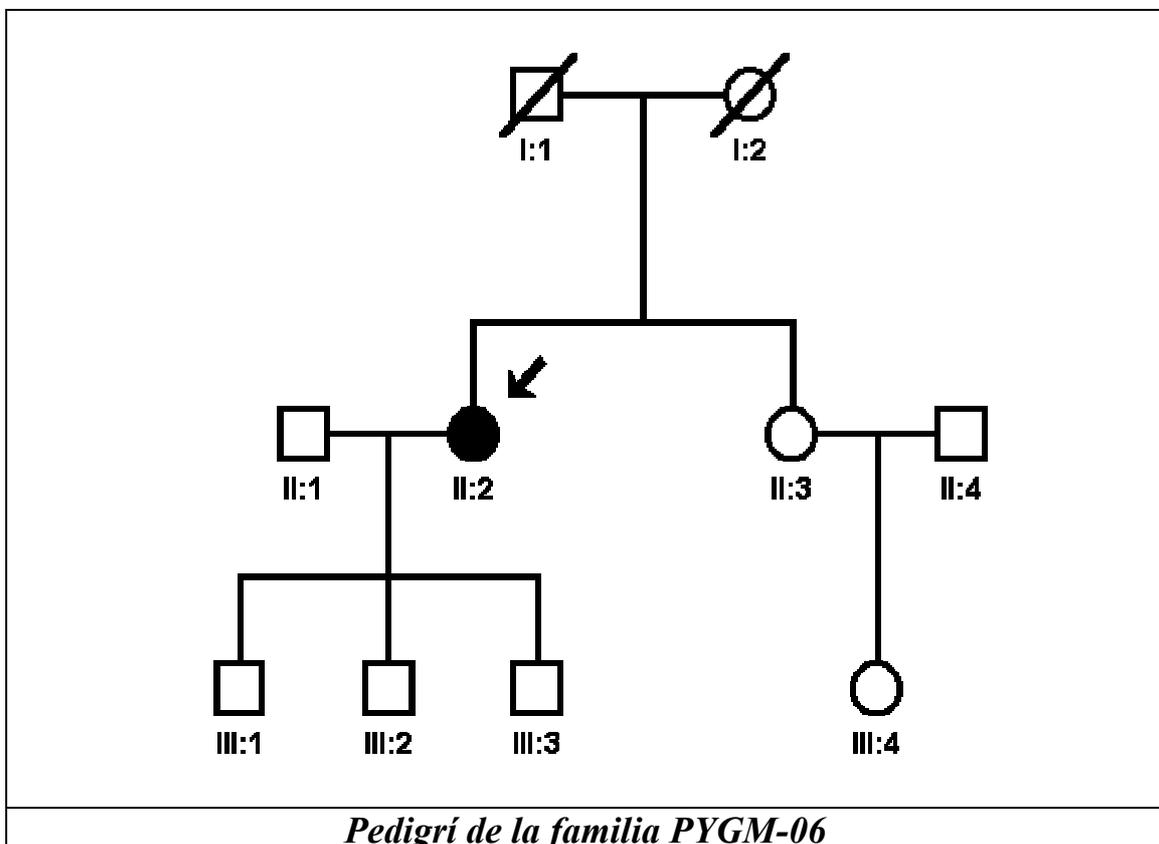
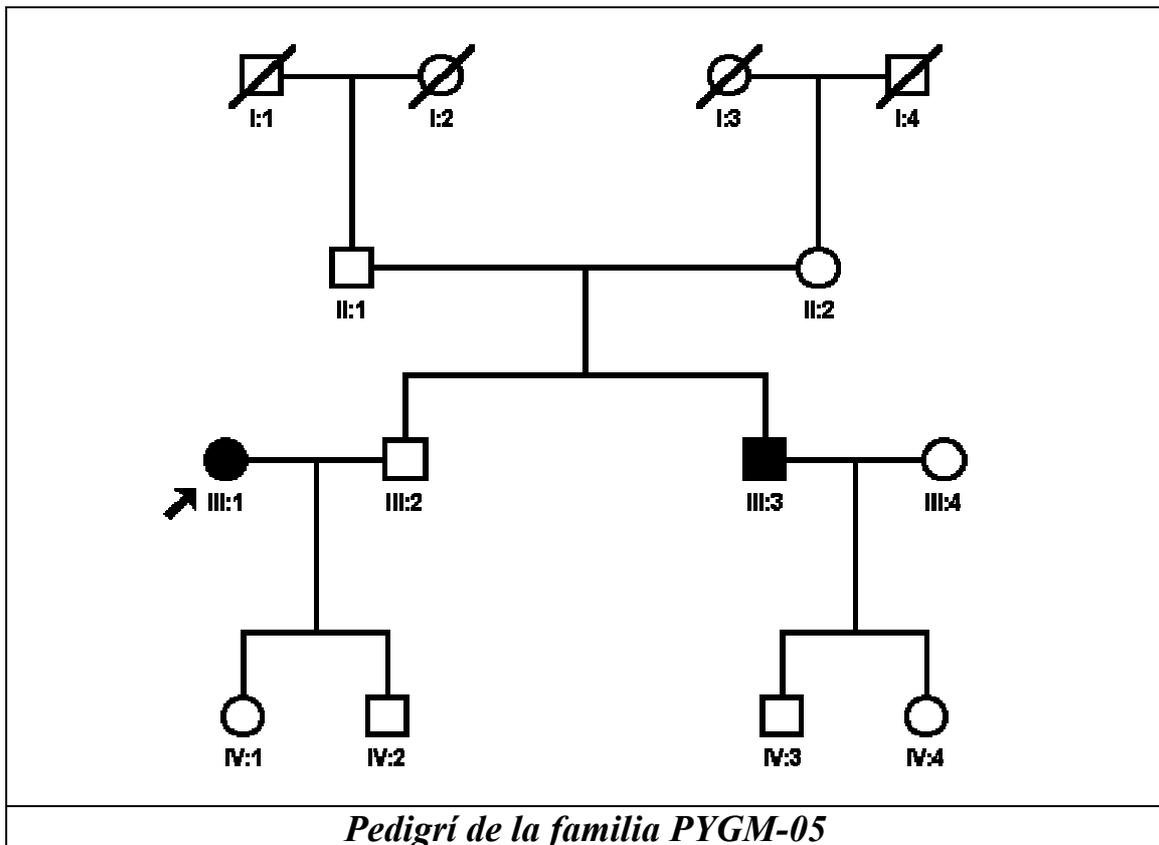
En cada una de las familias se estudió mediante entrevista:

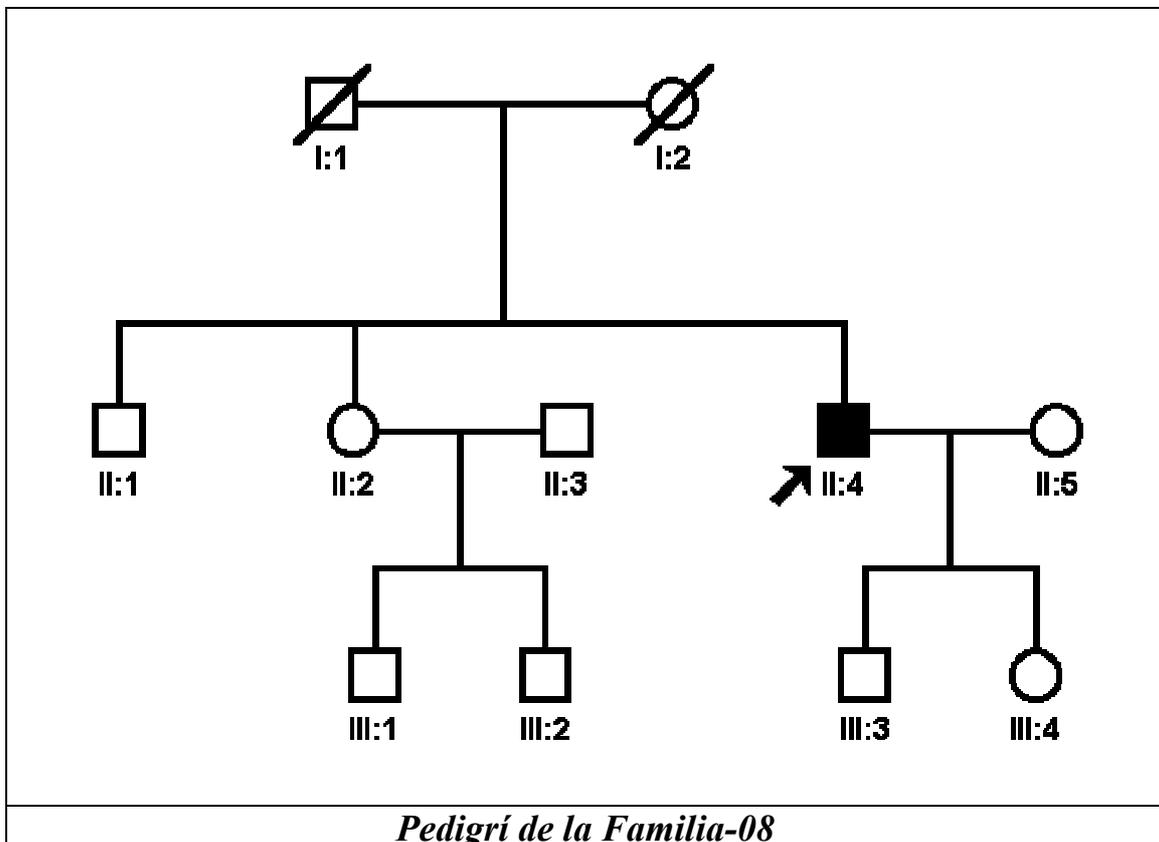
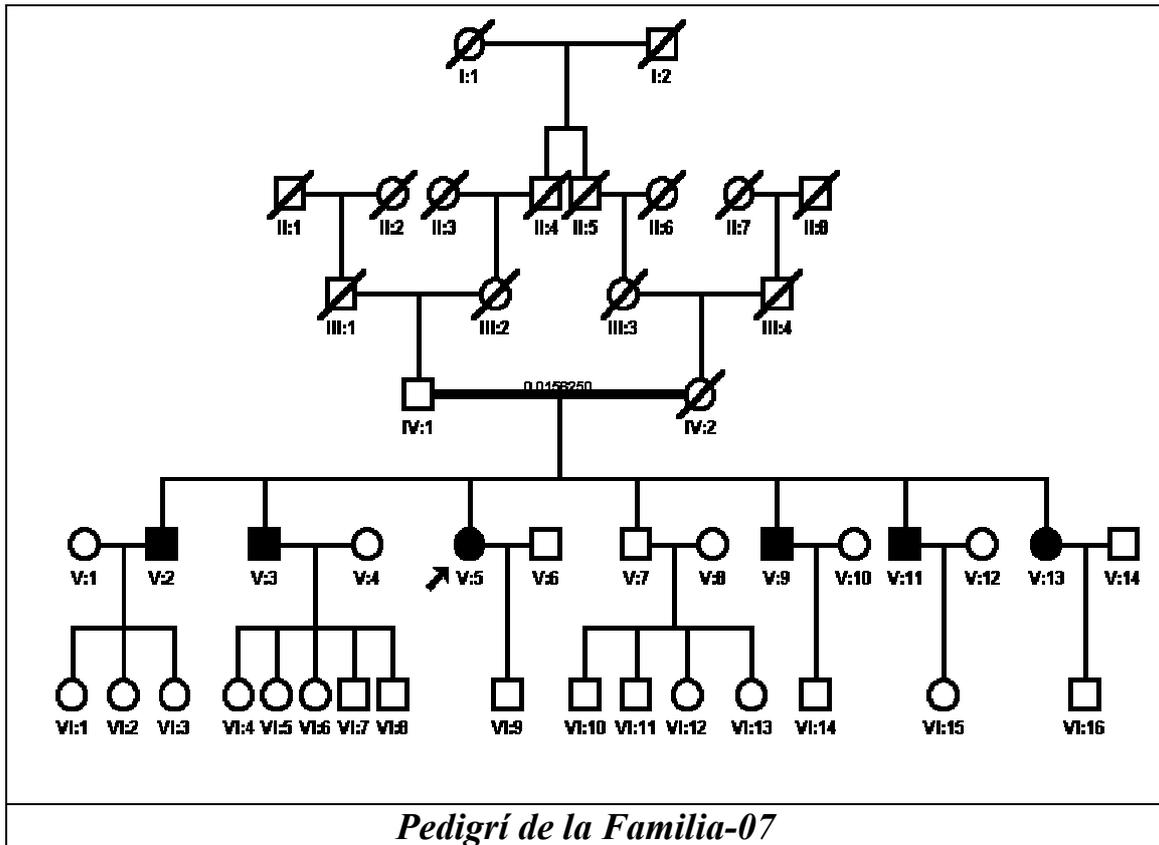
- Origen de los padres y abuelos.
- Características demográficas de las poblaciones de origen, especialmente número de habitantes y proximidad geográfica (en el caso que las poblaciones de origen del padre y de la madre fuesen distintas pero ubicadas en la misma provincia).
- Antecedentes de Consanguinidad.

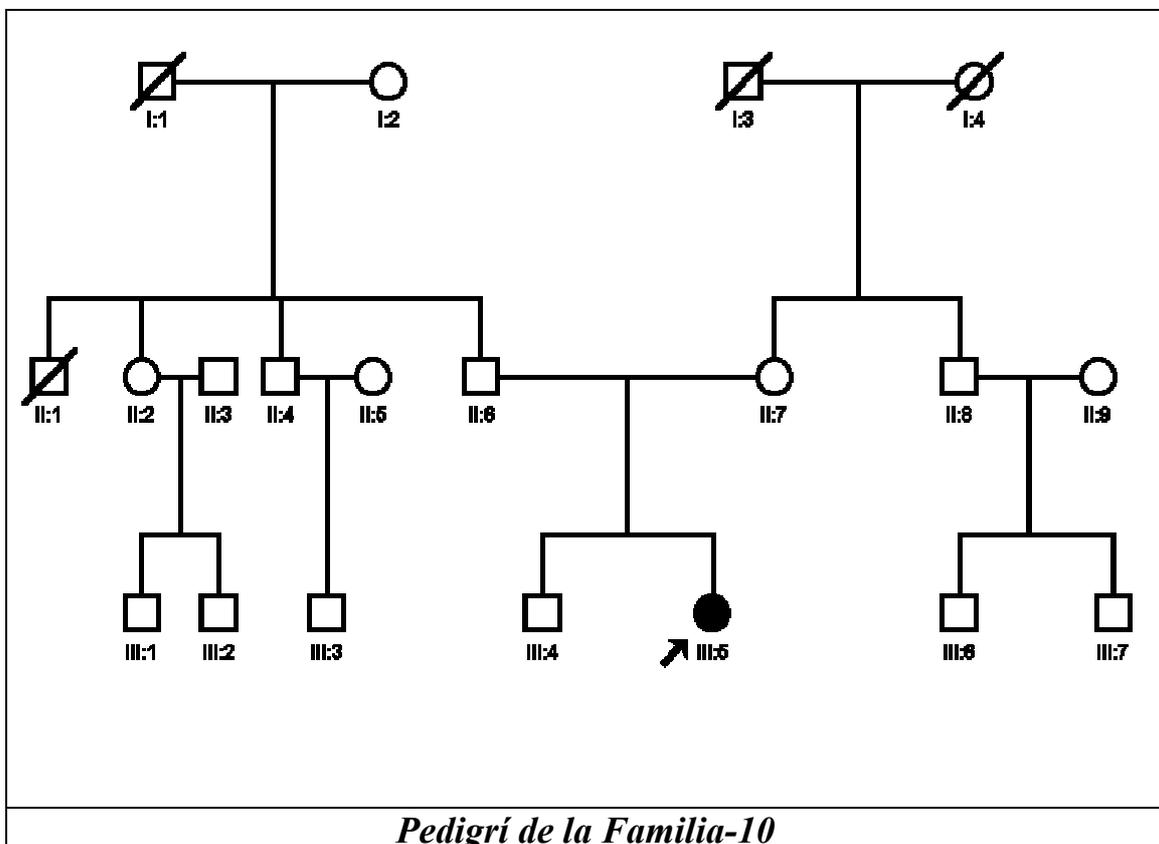
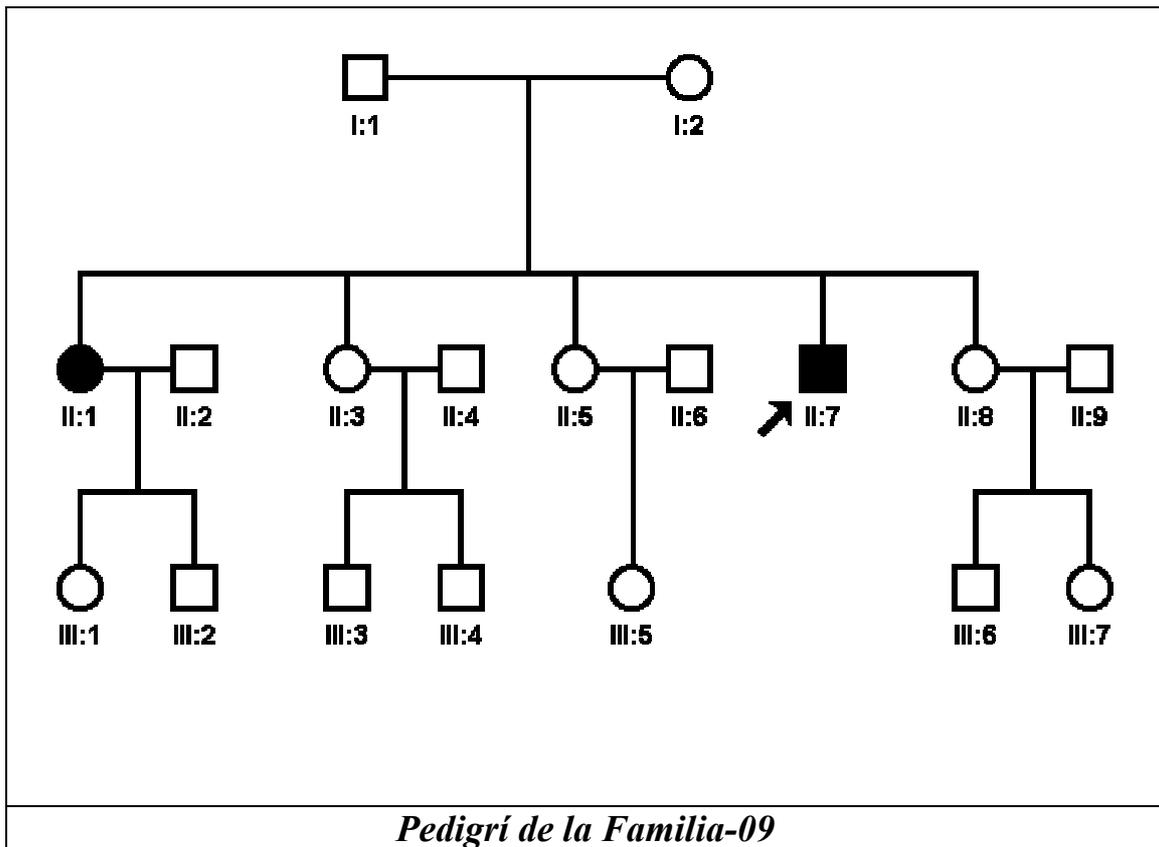
Los pedigrís de las familias estudiadas son:

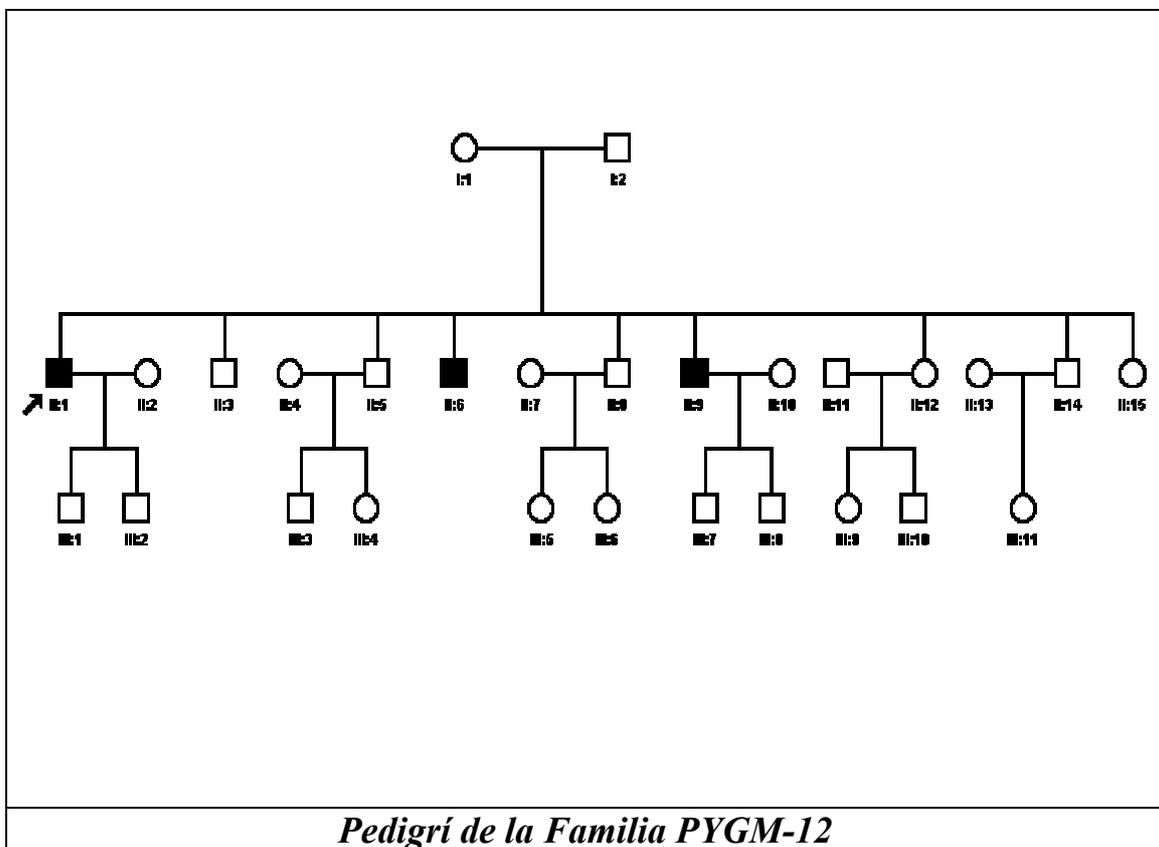
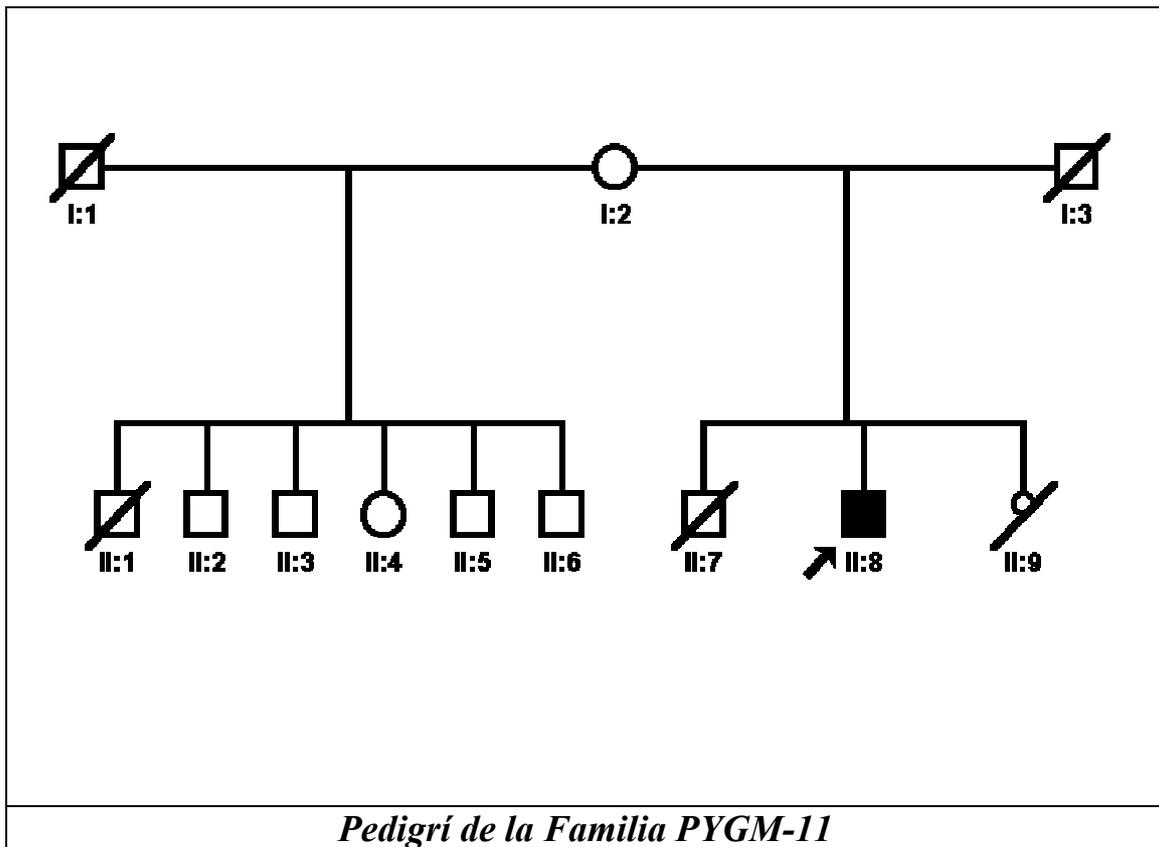


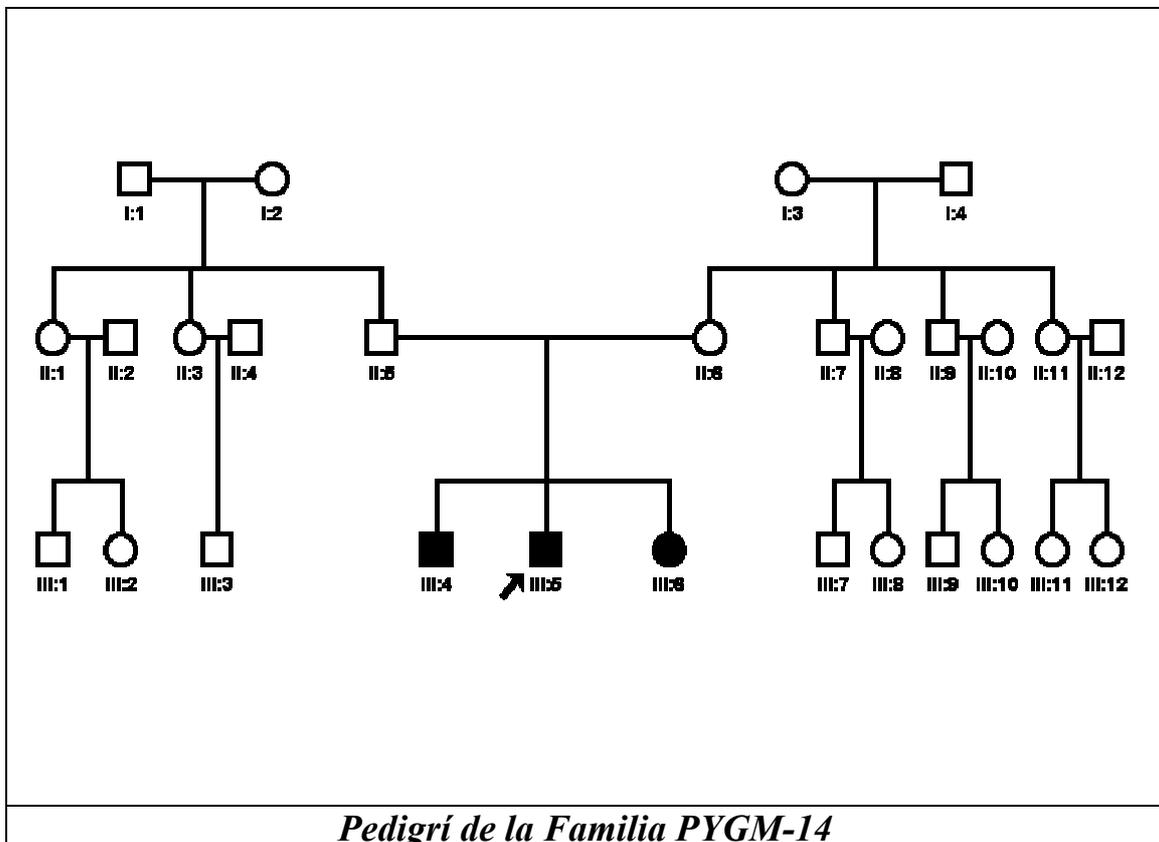
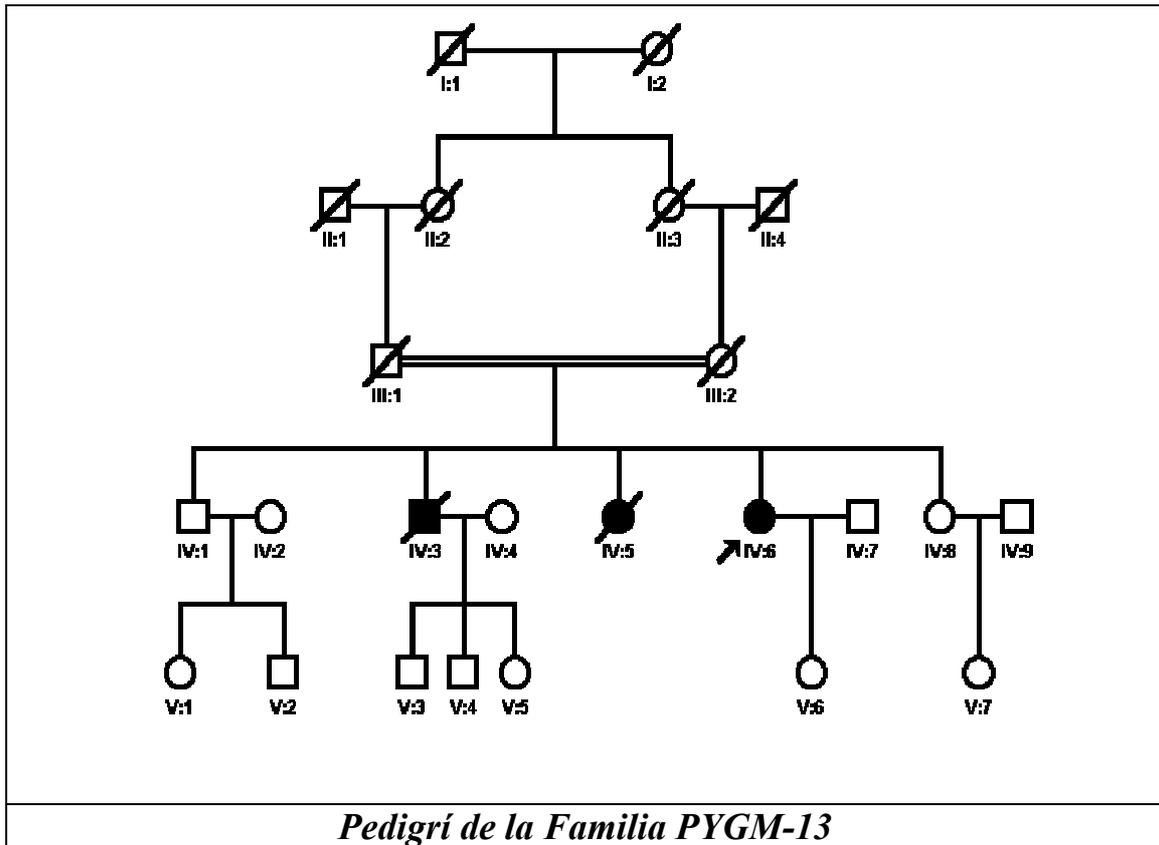


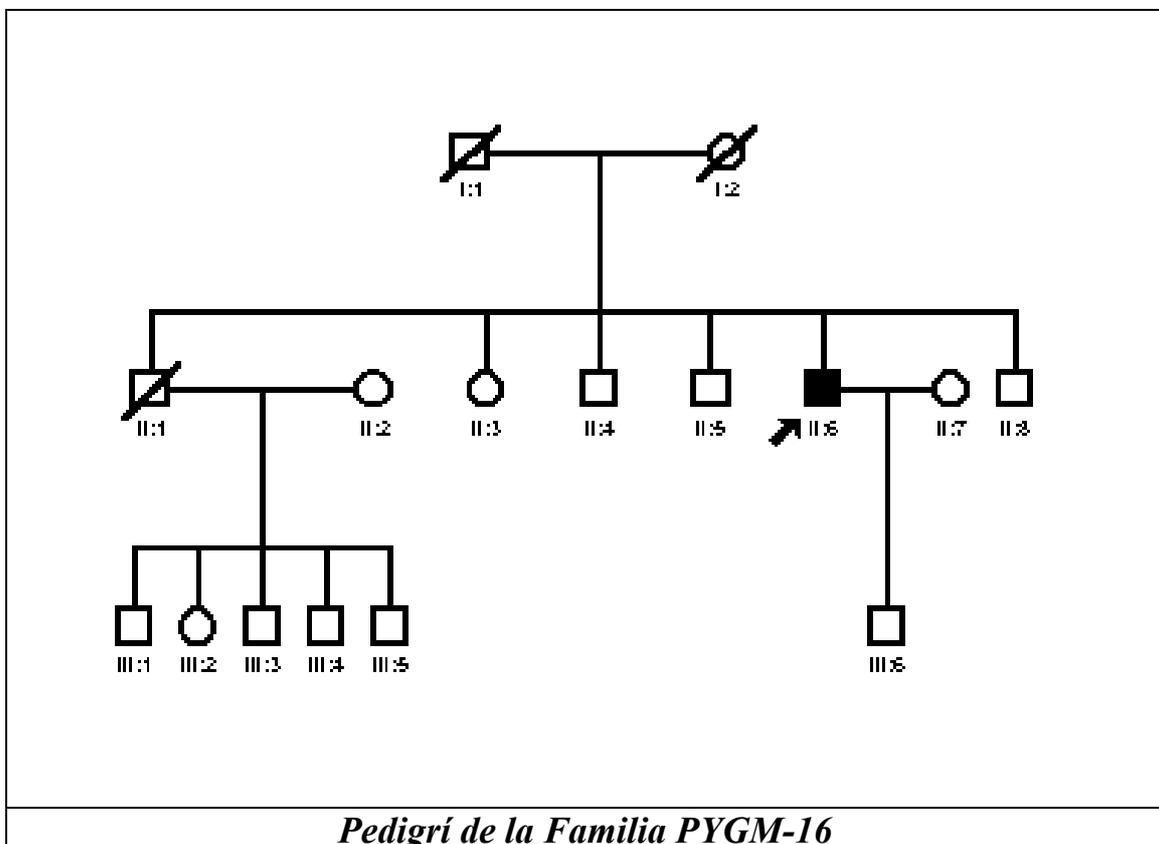
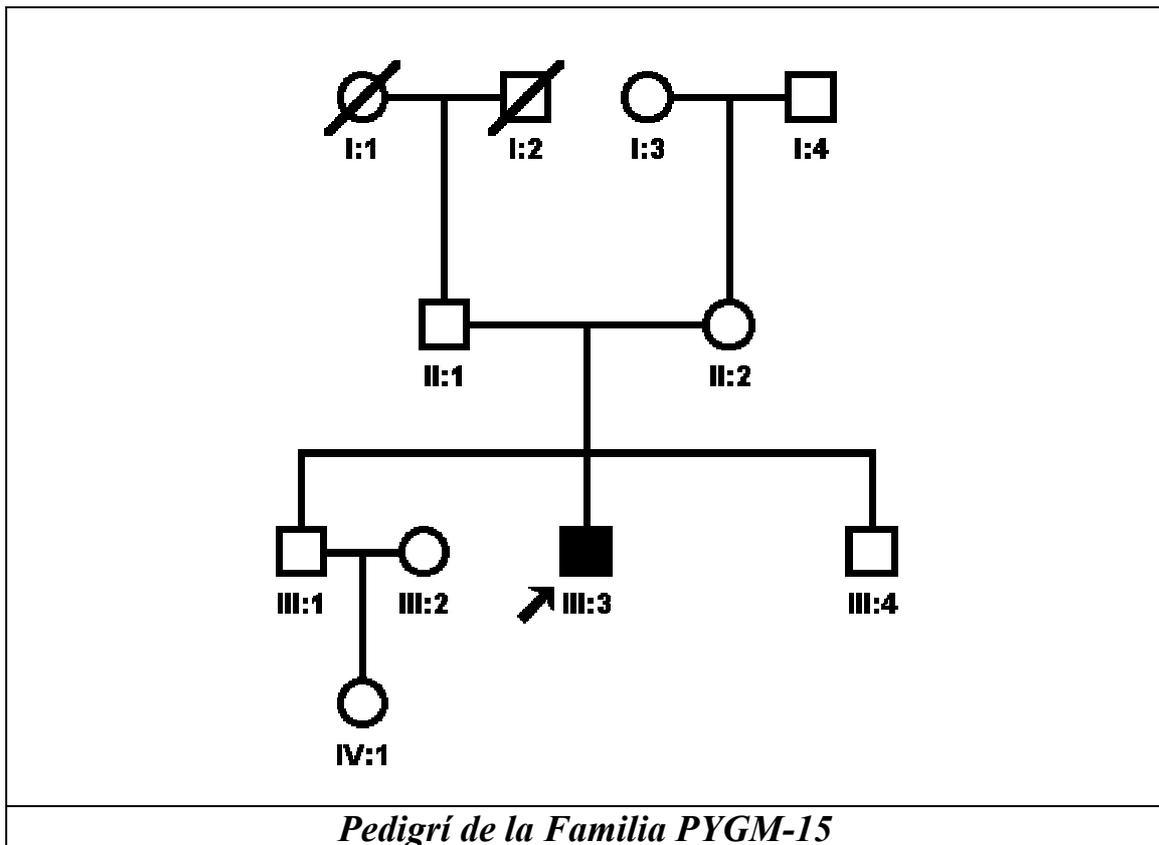


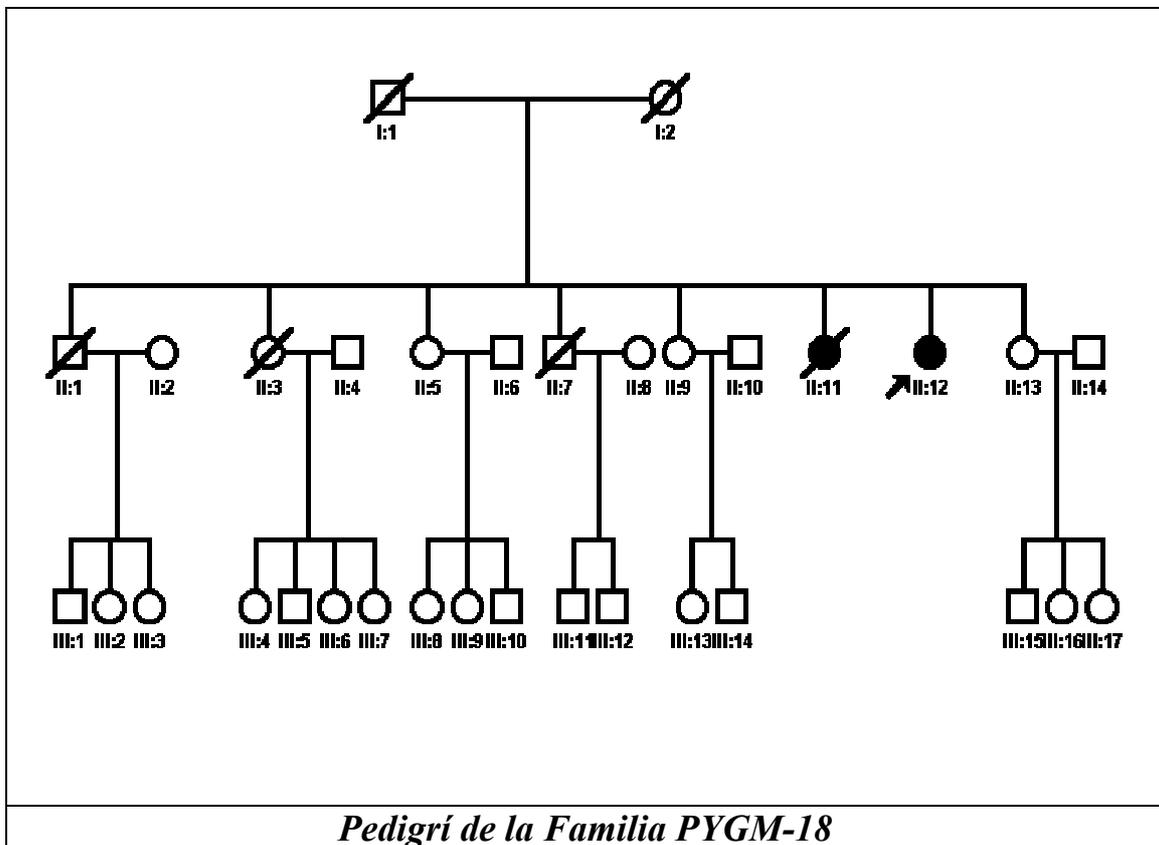
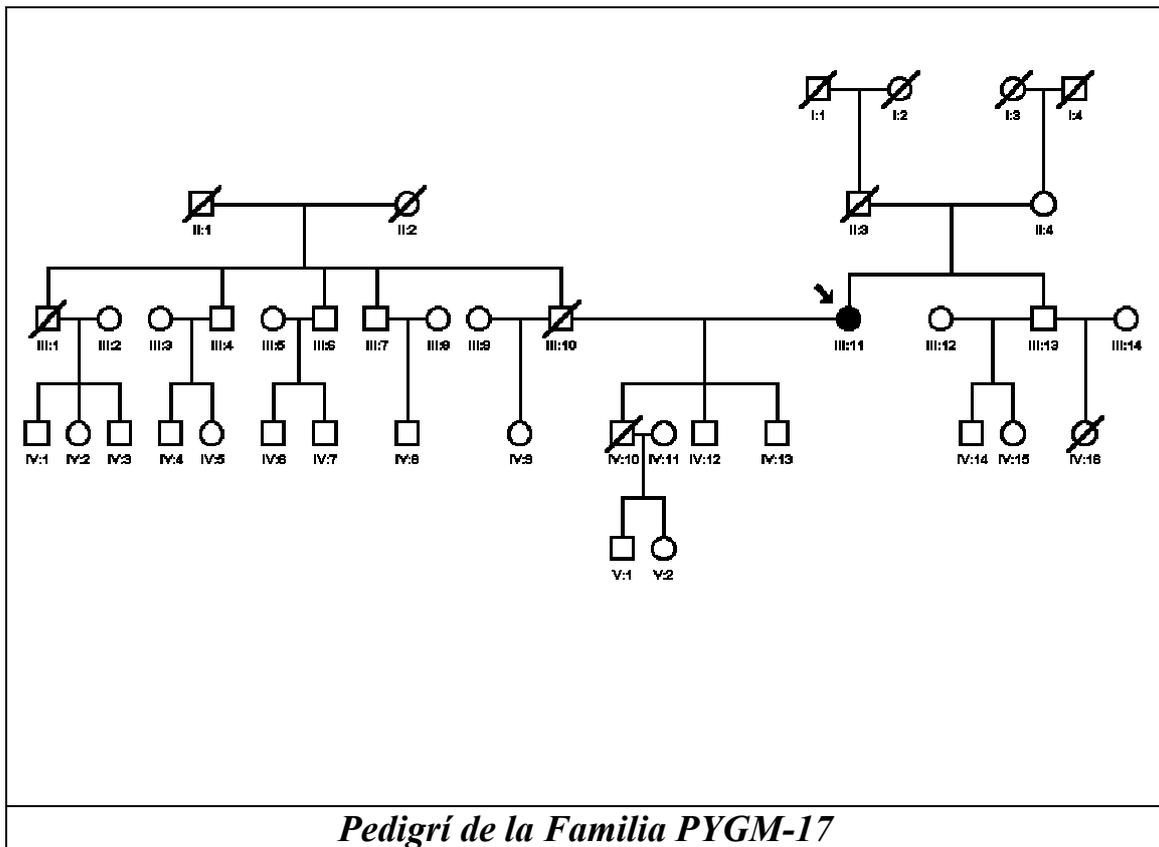


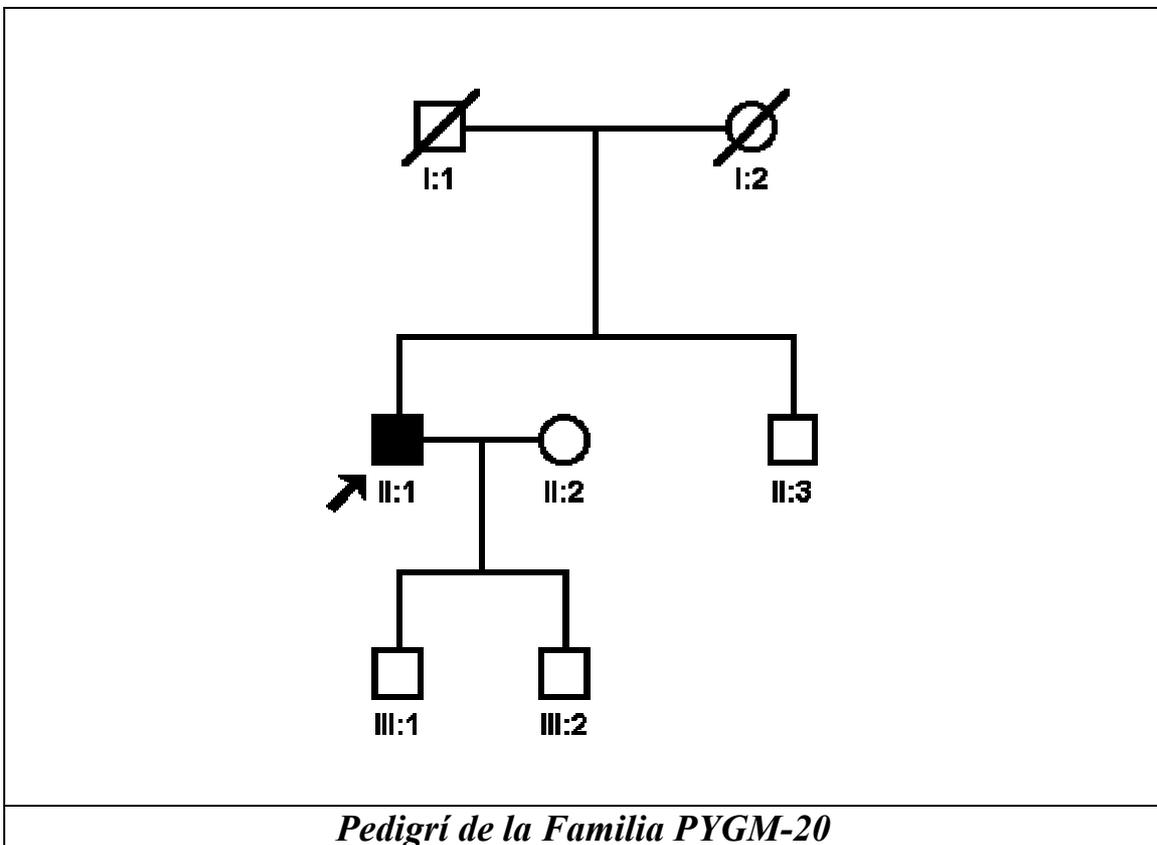
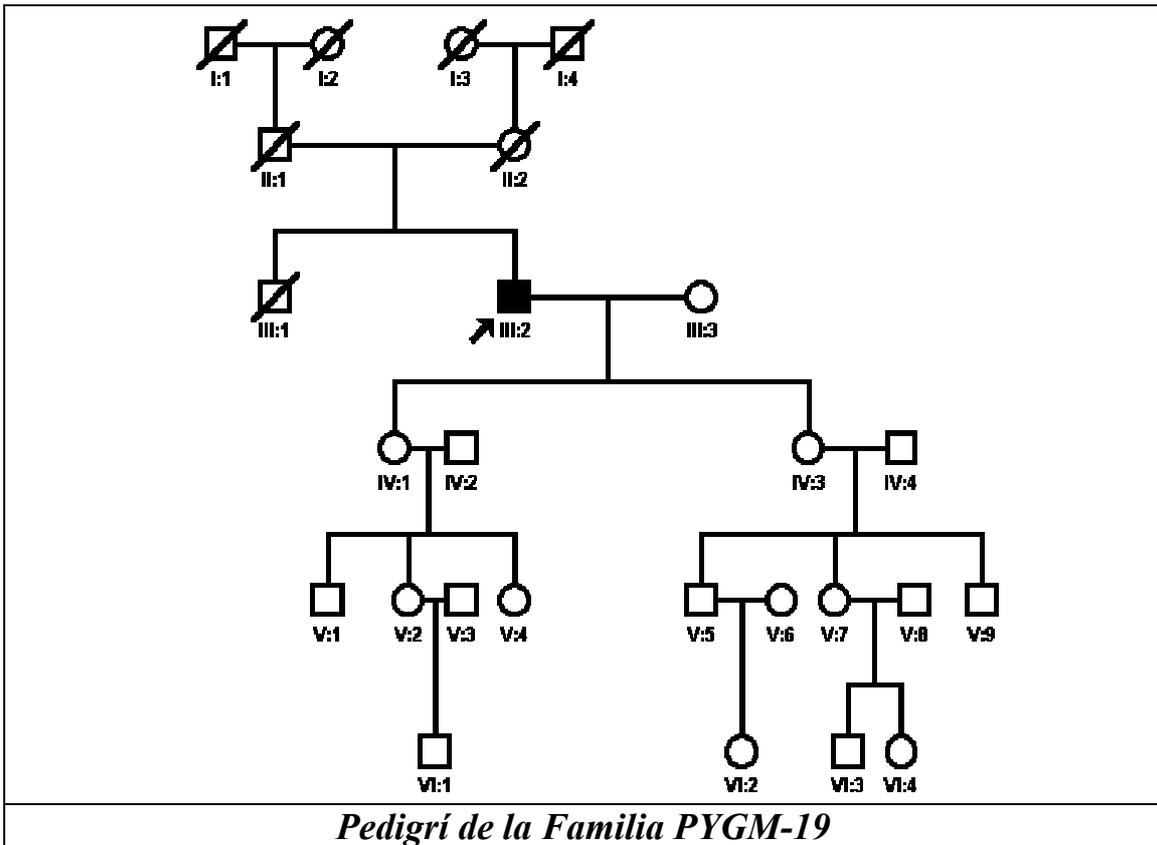


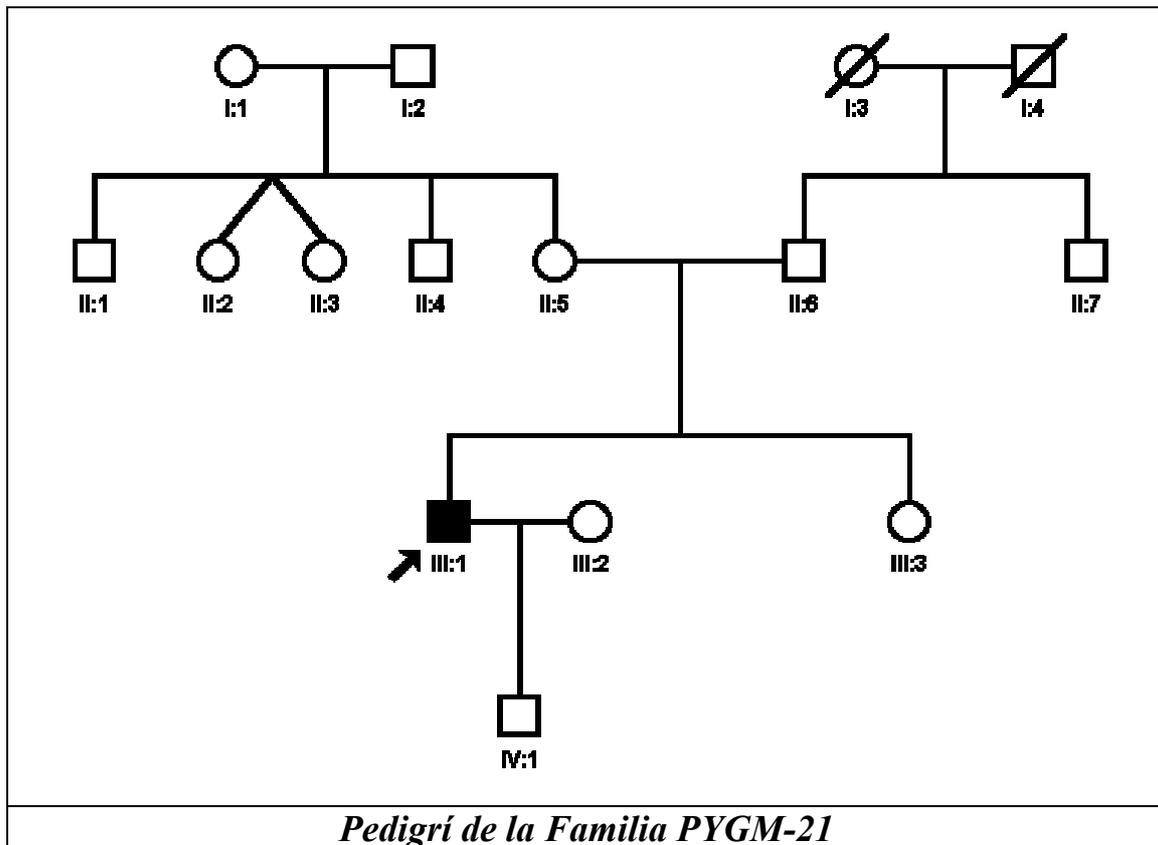












3.2.- MÉTODOS

3.2.1.- EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

3.2.1.1.- ENTREVISTA

Se diseñó un protocolo de entrevista que incluía las siguientes preguntas:

1. Edad.
2. Síntoma inicial.
3. Edad de inicio de los síntomas.
4. Tipo de ejercicios desencadenantes de los síntomas.
5. Presencia de contracturas.
6. Presencia de mialgias.

7. Ejercicios tolerados.
8. Ejercicios no tolerados.
9. Presencia de fenómeno de *Second wind*. Tiempo necesario para reiniciar el ejercicio.
10. Mioglobinuria / número de episodios.
11. Aparición de taquicardia en el ejercicio
12. Aparición de disnea en el ejercicio.
13. Complicaciones surgidas tras realizar esfuerzos extenuantes.
14. Actividad profesional.
15. Repercusión sobre su profesión o actividades diarias.

El protocolo incluía varios ejemplos de actividades potencialmente capaces de inducir síntomas: levantar o arrastrar objetos pesados, empujar un coche averiado, subir escaleras, subir una cuesta, hacer abdominales, correr distancias más o menos largas, saltar en cuclillas, hacer flexiones, realizar marchas, excursiones por la montaña, esprintar, correr sin moverse, montar en bicicleta, nadar, trepar por una cuerda, practicar golf, hacer gimnasia, jugar un rato a fútbol o baloncesto, andar a cuatro patas, hacer un paseo largo, mover muebles, mudanzas de vivienda, bailar, agacharse, llevar objetos pesados, andar por la playa, doblarse de cintura, estar de pie, caminar rápido, trabajar con los brazos en alto (por ejemplo, pintar un techo), tender la ropa, secarse el pelo, abrir la tapa de un bote, colgar los platos, mover una lavadora, correr para no perder el metro, tren o autobús, llevar paquetes, mascar chicle, levantar y llevar en hombros un niño, relaciones sexuales.

La entrevista incluía recogida de información respecto a la composición del pedigrí familiar, posibilidad de consanguinidad y datos demográficos poblacionales de cada una de las líneas de los progenitores. Se consultó el censo de la población española publicado por el Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es/>).

3.2.1.2.- EXPLORACIÓN FÍSICA:

Incluyó la evaluación de los siguientes parámetros:

3.2.1.2.1.- CONSTANTES

- Peso
- Talla
- Tensión Arterial
- Frecuencia Cardíaca
- BMI (índice de la masa corporal)

3.2.1.2.2.- EXPLORACIÓN NEUROLÓGICA ESPECÍFICA PARA ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES, que incluye:

- Examen Pares Craneales
- Balance muscular, utilizando la escala MRC en los siguientes grupos musculares (derecho e izquierdo):
 1. flexores del cuello
 2. extensores cuello
 3. deltoides
 4. pectoral
 5. bíceps braquial
 6. tríceps braquial
 7. extensor muñeca
 8. flexor muñeca
 9. extensores dedos
 10. flexores dedos
 11. interóseos
 12. eminencia tenar
 13. eminencia hipotenar
 14. paravertebrales
 15. psoas

16. glúteo
 17. cuádriceps
 18. bíceps crural
 19. tríceps sural
 20. tibial anterior
 21. peroneos
 22. flexor dedos pies y
 23. extensor propio del dedo gordo del pie.
- Investigación de signos negativos o positivos, como atrofia muscular, fasciculaciones, miotonía, mioquimias, contracturas y temblor.
 - Estudios de los reflejos musculares profundos.
 - Estudio de las sensibilidades epicrítica (algésica, táctil, térmica, doble estímulo) y profunda consciente (vibratoria, artrocinética) (Kendall 1986, Haerer 1992, MRC 2000, Gámez 2000).
 - Resistencia al Test del ejercicio isquémico del antebrazo, definida como el tiempo en segundos que tolera el paciente durante esta prueba hasta aparecer los signos de agarrotamiento en la mano.

3.2.2.- EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS.

3.2.2.1.- ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE RUTINA:

- Hemograma completo
- VSG (velocidad de sedimentación globular)
- glucosa
- creatinina
- urea
- creatinquinasa (CK)
- aspartato aminotransferasa (AST)
- alanina aminotransferasa (ALT)

- gamma-glutamilttransferasa (gammaGT)
- ácido úrico
- proteínas totales
- Ionograma: K, Na, P, Ca y Cl.

3.2.2.2.- ESTUDIO NEUROFISIOLÓGICO, que incluyó:

- Estudios de neurografía motora, sensitiva y respuestas F. Los nervios explorados incluyen al menos, mediano, cubital y ciático poplíteo externo.
- Estimulación repetitiva basal y post-esfuerzo
- Electromiograma (EMG). Se realizó registro de la actividad muscular en reposo, actividad voluntaria al máximo esfuerzo y análisis automático (*turns-amplitude*). En presencia de contractura se registró la actividad eléctrica. Se completó el estudio con un histograma de unidades motoras. Los músculos explorados incluían como mínimo: deltoides, bíceps braquial, extensor común dedos, cuádriceps y tibial anterior.

3.2.3.- EVALUACIÓN FUNCIONAL BIOQUÍMICA: EL TEST DEL EJERCICIO ISQUÉMICO (TEST DEL LACTATO).

Es un test fácil para evaluar la producción de lactato en el ejercicio en situación isquémica. Implica la determinación de lactato, piruvato y amoniaco en ejercicio, realizado en condiciones isquémicas. El único equipamiento requerido es un esfigmomanómetro y un dinamómetro.

3.2.3.1.- TÉCNICA. El paciente, en reposo y en ayunas, se acomoda en una camilla. Se procede a cateterizar una vena superficial de la extremidad superior (preferentemente antecubital, cefálica, cefálica accesoria, mediada del codo o basílica), utilizando una Valu-set® del calibre 23 (*Becton Dickinson Systems Inc., Sandy, UT*). Se procede a una extracción de 2 cc de sangre (extracción basal) y se mantiene la vía heparinizada. Del total de la muestra de sangre extraída, 1 cc es inmediatamente introducido en un tubo con ácido perclórico al 5%, preparado por el laboratorio. Se agita rápida y vigorosamente. Se deposita el tubo en una cubeta con hielo triturado. La sangre restante (1 ml) es introducida en un tubo con edetato cálcico disódico (EDTA) al 7,5% (*BD Vacutainer Systems, Preanalytical solutions, Plymouth, UK*) y se deposita también en la cubeta de hielo. Ambos tubos se rotulan con el n° 1 (extracción basal).

Acto seguido, se produce isquemia en la parte proximal del brazo mediante la insuflación del manguito de un esfigmomanómetro hasta alcanzar una presión de 200 mm Hg. Durante un minuto, el paciente realizará una serie de contracciones del puño, utilizando el dinamómetro de mano modelo Jamar (*Sammons Preston, Inc, Bolingbrook, IL*), a un ritmo de una por segundo, e intentando superar una resistencia/trabajo de 4 Kg. en cada una de las contracciones.

Finalizado el ejercicio, se deshincha el manguito y se obtienen muestras de sangre seriadas, cada una de 2 ml, al cabo de 1, 3, 5, 10 y 20 minutos después de finalizar el ejercicio. Entre las tomas, se mantiene la vía intravenosa permeable con una solución salina heparinizada.

De cada una de las muestras, 1 ml es introducido en un tubo con ácido perclórico y 1 ml en un tubo con EDTA. Se rotulan con los n^{os}. 2, 3, 4, 5 y 6. Se mantienen en la cubeta con hielo y se remiten inmediatamente al laboratorio para su análisis.

3.2.3.2.- ANÁLISIS DEL LACTATO.- Para la determinación de lactato, utilizamos el método enzimático adaptado al analizador Cobas-Mira (*Roche*) usando el reactivo 735 (*Sigma, St Louis, MO*). Este método consiste en convertir el lactato en piruvato + H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) por la acción de la enzima lactato oxidasa (Marbach 1967). Mediante una reacción complementaria acoplada, la enzima peroxidasa cataliza la

conversión del peróxido de hidrógeno en una sustancia coloreada que tiene un máximo de absorción a 540 nm, con lo que el incremento de absorbancia a 540 nm, es proporcional a la concentración de lactato en la muestra.

3.2.3.3.- ANÁLISIS DEL PIRUVATO.- Para la determinación del piruvato también utilizamos un método enzimático adaptado al analizador Cobas-Mira (*Roche*). El reactivo empleado es el 726-UV (*Sigma, St Louis, MO*). Este método consiste en convertir el piruvato y NADH (forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina) en lactato y NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina) a través de la enzima lactato deshidrogenasa.



En presencia de un exceso de NADH, prácticamente todo el piruvato se convierte en lactato y NAD (Marbach 1967). La oxidación del NADH origina una reducción de la absorbancia a 340 nm, que es proporcional al piruvato presente en la muestra.

3.3.3.4.- ANÁLISIS DEL AMONIACO.- Utilizamos el método enzimático que se basa en el consumo de NADPH (forma reducida del fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina) durante condensación de glutamato y 2-oxoglutarato catalizado por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) (Van Anken HC, 1974):



Para la determinación de amoniaco, utilizamos el método enzimático adaptado al analizador Cobas® Integra-700 usando el reactivo Cobas® Integra Amonia (*Roche*).

3.2.4.- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

La biopsia muscular, a pesar de ser una prueba cruenta, es una exploración complementaria considerada imprescindible para el diagnóstico de los pacientes con sospecha de Enfermedad de McArdle.

Además, la biopsia muscular permite profundizar las investigaciones necesarias en ciertos aspectos genéticos, bioquímicos, inmunohistoquímicos, así como tener la posibilidad de disponer de fibras musculares cultivadas.

De las diferentes técnicas de obtención de muestras de músculo, utilizamos la técnica de " biopsia a cielo abierto" ya que permite la toma de mayor cantidad de tejido muscular. De las otras técnicas, sólo utilizamos la biopsia con aguja. La empleamos en aquellos casos en que no disponemos de material (bien por que la biopsia se realizó en otro centro o años atrás), y se precisa músculo para completar ciertos estudios genéticos.

3.2.4.1.- TÉCNICA “A CIELO ABIERTO”.

La intervención se realiza bajo anestesia local. En niños y en pacientes con historial de cardiopatía, alergia a anestésicos locales u otros factores que impliquen la posibilidad de complicaciones se recomienda la presencia de un anestesista. Se procede a la esterilización del campo operatorio. Se escoge una de estas cuatro regiones: bíceps braquial, deltoides, cuádriceps, o tibial anterior. Después de preparar el campo operatorio mediante desinfección con Betadine®, se procede a la anestesia de piel, inyectando subcutáneamente 1 ml Scandicain®. Luego se infiltran el tejido celular subcutáneo y el músculo, empleando 6-8 ml del mismo preparado anestésico.

Se realiza una incisión en la piel de 4 cm de longitud siguiendo los pliegues cutáneos. Con el disector se separa el tejido subcutáneo, llegando a la fascia muscular. Con unas pinzas se tira de la fascia hacia afuera y se realiza un corte con las tijeras de unos 3-4 cm. Cuando el tejido muscular queda a la vista, se procede a realizar dos cortes paralelos separados por una distancia de 5 mm. Se introduce una pinza mosquito curvo por uno de estos cortes, profundizando y haciendo palanca con el fin de aislar un

fascículo de fibras musculares del tamaño de 5 mm de diámetro. Cuando la punta de las pinzas emerge por la zona paralela de la incisión muscular, se inserta una seda del 2/0, y se retrocede el mosquito. Se hace una ligadura con la seda. Se repite esta operación, hasta conseguir un fascículo de fibras musculares de 25 mm de largo, 4 mm de ancho y 4 mm de grosor. Se procede al corte de extremos consiguiendo la muestra de músculo, que es depositada en una gasa estéril humedecida con suero fisiológico y se guarda en un recipiente estéril. Se realiza una segunda toma de menor tamaño (3 mm x 10 mm), que se congela en un recipiente termorresistente que contiene nitrógeno líquido. Esta segunda muestra se emplea para el estudio de miopatías metabólicas producidas por déficit de enzimas termoinestables.

Se procede a la coagulación de zonas sangrantes mediante cauterización con bisturí eléctrico. A continuación, se realiza un cierre por planos, utilizando Vicril[®] o Dexon[®] 4/0 (*Sherwood Medical, St Louis, MO, USA*) como suturas reabsorbibles, y Prolene[®] 5/0 o 6/0 (*Johnson & Johnson Intl, Brussels, Belgium*) para la sutura cutánea. Se desinfecta nuevamente con Betadine[®], y se aplica un vendaje adhesivo Mepore[®] (*Mölnlycke Health Care AB, Göteborg, Sweden*). Se aconseja al paciente la aplicación de frío local durante 30 minutos.

En aquellas ocasiones en que precisamos cultivar la piel, la esterilización se realizó con alcohol, ya que los derivados yodados impiden el crecimiento de los fibroblastos en el medio de cultivo.

3.2.4.2.- TECNICA POR AGUJA. Se procede a la esterilización y preparación de un campo quirúrgico de 3 cm de diámetro. Se infiltra anestesia (Scandicain[®]) en piel (las mismas cantidades que en la técnica de cielo abierto). Luego se completa la anestesia inyectando unos 6 ml en tejido celular subcutáneo y músculo. Se realiza una incisión de bisturí de 1 cm de largo. Con una pinza mosquito se separa tejido celular subcutáneo. Se introduce la guía porta-agujas BioPince™ Coaxial Introducer Needle (*Amedic, Sollentuna, Sweden*) hasta una profundidad de 3-4 cm. Si el paciente es obeso, la distancia puede ser mayor. A través de la guía porta-agujas, se introduce la aguja BioPince VSL Biopsy Gun y se toman 3-5 muestras cilíndricas de tejido muscular, que

se depositan en una gasa humedecida en suero fisiológico en un recipiente estéril. Finalmente, se sutura la herida con un punto de Prolene[®] 5/0 o utilizando sutura cutánea adhesiva hipoalérgica Cicagraf[®] (*Smith & Nephew, Le Mans, France*).

3.2.4.3.- PROCESAMIENTO DE MUESTRAS. El fascículo de fibras musculares obtenido mediante la técnica de cielo abierto, es disecado en 4 muestras de mayor tamaño y una más pequeña para inclusión en glutaraldehído. Las muestras para estudios morfológicos, histoquímicos y genéticos deben ser de 2-3 mm de diámetro y 5-6 mm de largo. Dos de las muestras se sumergen directamente en nitrógeno líquido a -170°C para ser luego almacenadas en alicuotadas etiquetadas en el congelador a -70°C . Las otras dos muestras se sumergen en metilbutano previamente enfriado en nitrógeno líquido. Con el metilbutano a punto de congelar se sumergen las muestras durante 15 segundos. Posteriormente, se retiran del frasco con metilbutano y se almacenan en un congelador a una temperatura de -70° .

Si las muestras han sido obtenidas mediante aguja, se reparten dos para congelar directamente en nitrógeno y otras dos para congelar en metilbutano enfriado (Dubowitz 1985, Pample 1992, Mastaglia 1996,).

Se reserva una pequeña muestra de 0,5 mm x 1 mm, para examen ultraestructural, que se incluye en una solución de glutaraldehído al 2%.

3.2.4.3.1.- TINCIONES UTILIZADAS:

Las principales tinciones de rutina utilizadas son:

- **Hematoxilina-eosina (HE).** La técnica utilizada para la tinción HE fue:
 1. Sumergir la sección en hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
 2. Azulear en agua de Scott.
 3. Diferenciar en alcohol ácido al 0,2% hasta que aparezca una tonalidad rosa.
 4. Dejar en eosina al 1% durante 15-30 segundos.
 5. Lavado con agua destilada.

6. Deshidrato rápido.
7. Limpiar y montar en resina sintética.

- **Tricrómico modificado de Gomori.** La técnica utilizada fue:

1. Secar las secciones durante 2-20 minutos.
2. Teñir con la hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
3. Aclarar con agua destilada.
4. Teñir con el preparado tricrómico de Gomori durante 60 minutos.
5. Diferenciar rápidamente en ácido acético al 2% durante 3-5 segundos.
6. Deshidratar en la serie de alcoholes.
7. Limpiar y montar en resina artificial.

- **adenosinatrifosfatasa (ATPasa).** La técnica utilizada fue:

Para ATPasa a pH 9,4:

1. Incubar las secciones cortadas en frío a una temperatura de 37°C durante 30 minutos en la siguiente solución: 5 mg de ATP disuelto en tres gotas de agua destilada. Añadir 10 ml de buffer al 0,1 M de glicina/ClNa con Cl_2Ca 0,75 M. Ajustar a pH 9,4. Añadir 0,0309 g/10 ml (20 mM) de solución ditiotritol.
2. Aclarar en agua destilada.
3. Sumergir en Cl_2Ca al 2% durante 1 minuto, tres veces.
4. Aclarar en agua destilada.
5. Sumergir en una solución de sulfito amónico (1:10) durante 30 segundos.
6. Aclarar en agua tamponada.
7. Teñir con la hematoxilina de Harris durante 1 minuto y en azul tamponado.
8. Deshidratar, limpiar y montar.

Para ATPasa a pH 4,6 y 4,3:

1. Preincubar a 4° C en buffer de acetato sódico 0,1 M con 10 mM de EDTA, durante 10 minutos a pH 4,6 o 4,3.
2. Lavar en agua destilada.
3. Seguir el mismo procedimiento que para pH 9,4.

• **succinato deshidrogenasa (SDH).** La técnica utilizada fue:

1. Incubar a 37°C durante 30 minutos en la siguiente solución:

Succinato sódico	1000 mg
Nitroazul tetrazolio	100 mg
Metosulfato fenacina	0,25 mg
buffer TRIS 0,1 M	10 ml

2. Ajustar el pH a 7,0.
3. Extraer en acetona con el siguiente orden: 30%, 60%, 90%, 60% y 30%.
4. Aclarado en agua destilada.
5. Montar en gel de glicerina.

• **nicotinamida adenina dinucleotidotetrazolio (NADH-TR) reductasa.** La técnica utilizada fue:

1. Colocar las secciones en una placa de Petri con un filtro de papel húmedo.
2. Poner 1-2 gotas encima de la solución NADH, asegurándose de que la muestra esté completamente cubierta.
3. Incubar durante 30 minutos a 37°C.
4. Lavar en agua destilada.
5. Fijar en una solución de formalina al 15-20% durante 10 minutos.
6. Aclarar en agua destilada.
7. Montar en gel de glicerina.

Para eliminar la grasa, utilizar una pauta ascendente de acetona (30 %, 50%, 90%) y luego otra descendente.

- **PAS (ácido peryódico de Shiff)**. La técnica utilizada fue:
 1. Fijar las secciones en etanol acético durante 5-10 minutos.
 2. Lavar en agua destilada.
 3. Añadir ácido peryódico al 0,5% durante 2-5 minutos.
 4. Lavar en agua destilada.
 5. Poner reactivo de Shiff durante 10-15 minutos.
 6. Lavar en agua durante 5-10 minutos.
 7. Deshidratar en una serie ascendente de alcohol.
 8. Limpiar y montar en resina artificial.

- **Fosfatasa ácida**. La técnica utilizada fue:
 1. Incubar a 37°C con solución de incubación para fosfatasa ácida durante 1 hora.
 2. Lavado en agua destilada y en verde metil al 2% durante 1 minuto.
 3. Lavado en agua corriente.
 4. Montar en gel de glicerina.

- **Red Oil O**. La técnica utilizada fue:
 1. Aclarar las secciones en agua.
 2. Aclarar en alcohol isopropil al 60%.
 3. Transferir a tinción aceite rojo (*Red oil*) durante 10-30 minutos.
 4. Diferenciar en alcohol isopropil al 60%.
 5. Lavar en agua destilada.
 6. Teñir con hematoxilina de Harris durante 1 minuto.
 7. Aclarar en agua, hasta que la preparación adquiriera color azul.
 8. Montar en gel de glicerina.

- **COX (citocromo-c-oxidasa).** La técnica utilizada fue:
 1. Incubar las secciones en un medio de incubación para COX durante 60 minutos a una temperatura de 22° C.
 2. Lavar rápidamente en agua destilada.
 3. Deshidratar en una serie ascendente de alcohol
 4. Montar en resina sintética.

- **Miofosforilasa.** Debe tenerse cuidado al establecer el diagnóstico si la preparación de tintura de fosforilasa no es reciente. La técnica utilizada fue:
 1. Cortar láminas en frío del bloque congelado.
 2. Secar unos instantes al aire, luego incubar durante 1 hora a 37°C.
 3. Lavado rápido en agua destilada y dejar en alcohol al 40%.
 4. Desecar en un filtro de papel.
 5. Sumergir en sacarosa 0,32 M durante 1 minuto.
 6. Transferir a iodina de Lugol en sacarosa 0,32 M durante 1 minuto.
 7. Lavar en agua destilada.
 8. Montar en gel de glicerina.

- **AMP deaminasa (mioadenilato deaminasa).** Se incluye en aquellos pacientes que refieren intolerancia al ejercicio y mialgias.

- **Fosfofructoquinasa.** La técnica utilizada fue:
 1. Incubar las secciones a 37°C durante 1 hora en una placa de Petri, usando la solución de fructosa-6- fosfato o la de fructosa-1,6 difosfato.
 2. Lavado en agua destilada.
 3. Montar en gel de glicerina.

3.2.4.3.2.- COMPOSICIÓN DE LOS PREPARADOS UTILIZADOS:

Hematoxilina de Harris:

- Polvo hematoxilina de Harris 21,5 g
- Alcohol absoluto 10 ml
- Agua destilada 200 ml

Si se añade ácido acético glacial al 4% antes de su uso, se realiza la tinción de los núcleos.

Eosina:

- 5 g eosina/ 100 ml de agua destilada.

Diluir al 1% antes de su utilización.

Agua de Scott:

- Bicarbonato potásico 2g
- Sulfato magnésico 20 g
- Agua destilada 1 l

Preparado de Gomori:

- Cromotropa 2R 0,6 g
- Verde rápido 0,3 g
- Ácido fosfotungstico 0,6 g
- Ácido acético glacial 1,0 ml
- Agua destilada 100 ml

Buffer de glicina 0,1 M:

- Glicina 0,75 g
- NaCl 0,585 g

Enrasar con agua destilada hasta 100 ml.

Buffer de glicina 0,1 M/buffer ClNa con Cl₂Ca 0,75 M:

- Buffer glicina 0,1 M 50 ml
- Ca Cl₂ 0,75 M 10 ml

Añadir aproximadamente 22 ml. de NaOH hasta alcanzar un pH de 9,4.

Solución de ácido peryódico:

- 0,5 g de cristales de ácido peryódico disueltos en 100 ml de agua destilada.

Reactivo de Schiff:

- Fucsina básica 1g
- Agua destilada 200 ml
- Metabisulfito sódico 2 g
- ClH concentrado 2 ml
- Charcoal decolorante 2 g

Solución de incubación para fosfatasa ácida:

- Solución 1 0,25 ml
- Solución 2 2,5 ml
- Solución 3 0,4 ml
- Solución 4 0,4 ml
- Agua destilada 6,5 ml

Ajustar el pH a 4,7-5,0 con NaOH 0,1.

Solución 1 para tinción fosfatasa ácida:

- Fosfato AS-B1 naftol 0,5 mg
- Dimetilformida 0,5 ml

Solución 2 para tinción fosfatasa ácida:

- Buffer acetato de veronal preparado con 1,17 g de acetato sódico y 2,94 de barbitona sódica. Enrasar hasta 100 ml con agua destilada.

Solución 3 para tinción fosfatasa ácida:

- Nitrito sódico 40 mg
- Agua destilada 1 ml

Solución 4 para tinción fosfatasa ácida:

- Cloruro de pararosanilina 2 mg
- ClH 2N 50 ml

Solución *Red Oil O*:

- Preparar una solución saturada de *red oil O* en alcohol isopropil al 0,5%.

Medio de incubación para Mifosforilasa:

- Glucosa-1-fosfato 50 mg
- Adenosina-5-ácido monofosfórico 10 mg
- EDTA 25 mg
- Flurouro sódico 20 mg
- Dextrano 1g
- Buffer acetato 0,1 M, pH 5,9 6 ml
- Etanol absoluto 1 ml

Ajustar a pH 5,9 antes de utilizarlo.

Buffer acetato 0,1 M, pH 5,9:

- Acetato sódico 0,1 M 4,5 ml
- Ácido acético 0,1M 0,5 ml
- Agua destilada 5 ml

Solución de fructosa-6-fosfato:

- Arsenato sódico 20 mM pH 7,0 8 ml
- Fructosa-6-fosfato 10 mM 3,2 ml
- NAD 10 mM 1,6 ml
- Adenosina trifosfato 10 mM 1,6 ml
- Sulfato de magnesio 40 mM 0,4 ml
- Nitroazul de Tetrazolio 6,4 ml
- Agua destilada 1,2 ml

Ajustar a pH 7,0

Solución de fructosa-1,6 difosfato:

• Arsenato sódico 20 mM pH 8,6	8,0 ml
• Fructosa-1,6-difosfato 10 mM	3,2 ml
• NAD 10 mM	1,6 ml
• Nitroazul tetrazolio	6,4 ml
• Agua destilada	3,2 ml

Ajustar a pH 8,6

Solución NADH:

• Solución NADH para almacenar	1ml
• NADH	1mg

Solución NADH para almacenar:

• Nitroazul tetrazolio 1mg/ml	6,25 mg
• Buffer TRIS 0,2 M pH 7,4	6,25 ml
• Cloruro de Cobalto 0,5 M*	1,25 ml
• Agua destilada	8,75 mg

* Cl_2Co 0,5 M = 11,9 g/100 ml de agua destilada. Conservar a -20°C .

Solución de incubación para COX:

• Tetracloruro de 3,3'-diaminobencidina	5 mg
• Buffer fosfato 50 mM (pH 7,4)	9 mg
• Solución de catalasa (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1 ml
• Citocromo C (tipo II)	10 mg
• Sacarosa	750 mg

3.2.5.- ESTUDIOS GENÉTICO-MOLECULARES.

3.2.5.1.- EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

Previa autorización y consentimiento informado de cada uno de los individuos, se realizó extracción, en ayunas, de sangre periférica mediante venopunción utilizando

sistema de agujas Vacutainer®. En individuos con venas superficiales, difícilmente accesibles, utilizamos como alternativas las agujas intradérmicas BD Microlance 3 (*Becton Dickinson, Fraga, España*) 20 G x 1 o Valu-set® del calibre 23 (*Becton Dickinson Systems Inc., Sandy, UT*) para la extracción de sangre.

Se recogió un volumen de 5 ml de sangre utilizando tubos BD Vacutainer K3E que contenían EDTA al 15% (*BD Vacutainer Systems, Prenalytical Solutions. Plymouth, UK*) como anticoagulante.

3.2.5.2.- EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL A PARTIR DE SANGRE TOTAL PERIFÉRICA (MÉTODO *SALTING-OUT*).(Miller 1988)

Lavado de las células

Se procede a realizar un lavado de las células (se produce una hemólisis):

- Depositar 5 ml de sangre en tubos tipo *Falcon* de 15 ml.
- Añadir solución salina fisiológica (ClNa a 0,9 gramos/litro) (*Suero fisiológico Grifols®*) hasta alcanzar 12,5 ml.
- Centrifugar durante 20 minutos a 1300 g a 4°C (*Centrífuga Sorvall*).
- Descartar el sobrenadante, extrayéndolo a temperatura ambiente con una pipeta.

Lisis de eritrocitos

- Añadir 12,5 ml de tampón de lisis de eritrocitos (TLE).
- Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos, agitándolos manualmente varias veces.
- Centrifugar durante 15 minutos a 1900 g a 4°C.
- Descartar el sobrenadante.
- Repetir el proceso con 12,5 ml más de tampón de lisis .
- Incubar 5 minutos en hielo.

- Este proceso lisa totalmente los eritrocitos. En aquellos casos en que el *pellet* tenga un aspecto rojizo, se realiza un tercer ciclo de lisis.

Lisis de leucocitos y digestión de proteínas.

- Añadir 750 μ l (microlitros) de tampón de lisis de leucocitos (TLL), 50 μ l de SDS (dodecil sulfato sódico) (*Sigma*) al 10% y 125 μ l de proteinasa K a una concentración de 2 mg/ml (miligramos/mililitro).
- Mezclar con la pipeta.
- Incubar los tubos a 50° C en agitación durante 5 horas (en un baño con agitación, *Aqua Shaler-Adoplh Kuhner*), homogeneizando con pipeta varias veces durante la incubación.

Extracción salina.

- Añadir 250 μ l de NaCl (*Merck*) saturado 5,5 M (mol/litro).
- Agitar mediante *vórtex* hasta obtener una mezcla espumosa.
- Centrifugar durante 20 minutos a 3000 g.
- Recoger el sobrenadante y pasarlo a un tubo limpio.
- Repetir la centrifugación para extraer el exceso de sales.
- Volver a recoger el sobrenadante en otro tubo limpio.
- Añadir un volumen de cloroformo (1175 μ l) (*QCA*), disolvente orgánico que permite separar proteínas y ácidos nucleicos.
- Agitar la mezcla manualmente durante 15 segundos.
- Centrifugar durante 10 minutos a 1900 g. Se obtienen 3 fases: La superior acuosa donde se encuentra el ADN, una interfase donde están las proteínas y una fase inferior de cloroformo.
- Recoger la fase acuosa y pasarla a un tubo limpio.
- Añadir 117,5 μ l de NaAc (acetato sódico) (*Merck*) 3M a pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto (*Merck*) a -20°C (la sal, juntamente con el alcohol, precipitan el ADN).

- Agitar la mezcla vigorosamente hasta que aparezca la medusa o algodón de ADN.
- Recoger la medusa con una pipeta *Pasteur*.

Lavado, preparación de la solución y medida de la concentración.

- Lavado de la medusa con etanol al 70%.
- Disolver en 500 μ l de tampón Tris-EDTA (TE) a pH 8.
- Incubar durante 20 minutos en un baño (*Thermomix MM BBraun*) a 37°C.
- De esta solución madre, tomar un pequeño volumen para valorar la concentración, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nanómetros (nm) (preparamos una dilución 1:40, tomando 2 μ l de la solución madre + 78 μ l de agua, utilizando 2 μ l de tampón TE para preparar el blanco). La relación entre los valores de densidades ópticas de 260/280 nm nos indicará la pureza del ADN (que no debe contener un exceso de material proteico o de solvente orgánico), siendo aconsejable que este valor esté entre 1,7 y 2 (Sambrook 1989). El cálculo de la concentración en μ g/ml (microgramos/mililitro) viene dado por la multiplicación del valor de absorbancia a 260 nm por el factor de dilución y por 50, el factor específico para el ADN. Utilizamos un espectrofotómetro *Amersham Pharmacia*.
- Congelar la solución a -20° C.

Tampones y reactivos utilizados:

1. TLE:

- 5 ml de Tris 2M (*Sigma*) a pH 7,5
- 2,5 ml de MgCl₂ (*Merck*) 1M
- 492,5 ml de agua bidestilada-MilliQ

2. TLL:

- 40 ml de NaCl (*Merck*) 5M
- 4 ml de EDTA (*Boehringer Mannheim*) 0,25 M a pH 8,0
- 2,5 ml de Tris 2M (*Sigma*) a pH 7,5.

Enrasar hasta 500 ml con agua milliQ.

3. Solución Proteinasa K:

- 2 mg de Proteinasa K (*Roche*)
- 100 µl de SDS (*Sigma*) al 10 %
- 4 µl de EDTA (*Boehringer Mannheim*) 0,5 M.

Enrasar con agua milliQ hasta 1 ml

4. TE:

- 1 ml de Tris 2M a pH 7,5
- 8 µl de EDTA 0,25 M a pH 8,0

Enrasar hasta 100 ml con agua milliQ y autoclavar

Autoclave utilizando: *Matachana*

Purificador de agua MilliQ_{plus} *Millipore*

3.2.5.3 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE MÚSCULO (MÉTODO CHOMCZINSKY-SACCHI). (Chomezinsky y Sacchi 1987)

Homogeneización de la muestra

A partir de una biopsia de músculo de unos 150 mg se procede a su homogeneización. Todo el procedimiento se realiza en condiciones libres de RNasa:

- Mantener la muestra de tejido en hielo seco.
- Limpiar el homogeneizador (*Politron[®]-PCU-Kinematica*) sumergiéndolo durante 1 hora en NaOH (*Merck*) 5M y después 1 hora en agua RNasa *free* (tratada con dietilpirocarbonato-DEPC) (*Sigma*).
- Pipetear 4 ml de solución D en un tubo estéril de plástico de 10 ml (*Sarstedt*).
- Introducir la biopsia en el tubo.
- Homogeneizar la biopsia sin descongelarla durante unos 45 segundos.

Extracción fenólica

- Traspasar el homogeneizado a un tubo de cristal (*Corex*[®]), añadir 4 ml de Solución D y mezclar.
- Añadir 0,8 ml de NaAc (*Merck*) 2M a pH 4,0 y vortexar.
- Añadir 8 ml de fenol (*Merck*) equilibrado con agua DEPC.
- Añadir 1,6 ml de cloroformo (*QCA*) y agitar intensamente.
- Dejar en hielo durante 15 minutos.
- Centrifugar a 7650 g (*Sorvall*) durante 30 minutos a 4°C.
- Pasar el sobrenadante a otro tubo *Corex*[®] procurando no arrastrar la interfase.
- Añadir un volumen de isopropanol (*Merck*) a -20°C.
- Agitar fuertemente e incubar a -20°C, como mínimo, durante 1 hora.
- Centrifugar a 7650 g durante 30 minutos a 4°C.
- Decantar el sobrenadante.
- Resuspender el *pellet* en 400 µl de solución D.
- Pasar el volumen resuspendido a un tubo *Eppendorf*.
- Añadir un volumen de isopropanol a -20°C y dejar precipitar durante toda la noche a -20°C.
- Centrifugar a 13500 g (centrífuga *Eppendorf* 5415) durante 30 minutos a 4°C.
- Sacar el sobrenadante y añadir 1 ml de etanol al 80 % (con agua DEPC) a -20°C para lavar.
- Volver a centrifugar a 13500 g durante 20-30 minutos a 4°C.
- Sacar el sobrenadante y dejar secar el *pellet* durante 2 minutos.
- Reconstituir el *pellet* con 50 µl de agua DEPC a pH 8,5.
- Preparar una dilución para medir la absorbancia (por ejemplo, 2 µl de la solución y 78 µl de agua DEPC) tal como se realiza con el ADN y calcular igualmente la concentración, pero utilizando aquí un factor de 40.

- Resolver 2 µl de la solución final en un gel de agarosa (*Bio Rad*) al 1 % para valorar la pureza e integridad del ARN. Se han de ver las bandas correspondientes a los ARNs ribosómicos 24S y 18S.
- Congelar la solución a -80°C.

Tampones y reactivos utilizados

5. Agua-DEPC:

- Añadir 1 ml de DEPC (*Sigma*) en 1 litro de agua milliQ.
- Agitar vigorosamente y dejar reposar durante una noche.
- Volver a agitar intensamente y autoclavar.

6. Solució D: (Para 500 ml)

- 200 g de tiocianato de guanidina (*Boehringer Mannheim*)
- 14,08 ml de Citrato Sódico (*Fluka*) 0,75M a pH 7,0
- 21,12 ml de Sarcosil (*Sigma*) al 10 %
- 234,4 ml de agua DEPC
- Calentar la mezcla a 65°C (baño *Braun*) con el objetivo de disolverla. Una vez que esté fría, añadir 360 µl de β-Mercaptoetanol (*Sigma*) para cada 50 µl de solución D.

7. Fenol-Agua DEPC:

- Equilibrar volumen/volumen con agua DEPC 2 veces.
- Añadir 0,5 g de hidroxiquinoleina (*Sigma*) a 500 ml de fenol.

3.2.5.4.- AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA MIOFOSFORILASA (PYGM)

Reacción PCR para el análisis de los exones:

Se amplificó la secuencia codificante de la totalidad del gen (20 exones) mediante reacción en cadena polimerasa (*PCR Long-range*) a partir de ADN genómico. La *PCR Long-range*, se realizó mediante el *Expand™ Long Template PCR System (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)*. Para amplificar los exones y las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen de la PYGM, se realizaron reacciones de PCR utilizando los 28 *primers* intrónicos descritos por Kubisch (Kubisch 1998), de unos 20 a 24 nucleótidos con temperaturas de *melting* (*Tm*) de alrededor de 60°C en condiciones estándar,

variando solo de acuerdo con las temperaturas de *annealing*, entre 55 °C y 65 °C, en función de su T_m . La T_m se calcula a partir de la fórmula (Suggs 1981):

$$T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

Los *primers* intrónicos utilizados, que permiten analizar la totalidad de la región codificante incluidos sus *splice junction*, fueron diseñados a partir de la secuencia de referencia de la miofosforilasa de acuerdo con Kubish (Tabla 2) (Nº de acceso a *GenBank* U94774-U94777). Las secuencias 5'-3' de los 28 *primers* intrónicos, las temperaturas de *annealing* y el tamaño (de 235 bp a 903 bp) de los fragmentos de los productos PCR se detallan en la tabla. Todos los *primers* utilizados han sido sintetizados por Boehringer-Mannheim Roche, Mannheim, Alemania.

El análisis de secuencia y alineamientos fueron realizados usando el programa MACAW (Schuler 1991). Cada producto de PCR fue secuenciado en ambas direcciones, y cada análisis se realizó como mínimo, por duplicado, independientemente. Para cada exón y paciente se realizó un ensayo negativo substituyendo el ADN por agua.

La amplificación mediante los *primers* exónicos da lugar a productos de PCR de un tamaño aproximado de 1 a 5 kb, conteniendo uno o más intrones y la secuencia codificante del gen de la PYGM. Los datos de las secuencias obtenidas mediante secuenciación directa de los productos PCR, están disponibles en el *GenBank* con el código de acceso M32579-M32598.

En la Tabla 2 se describen los *primers* intrónicos utilizados para la amplificación por PCR del gen de la Miofosforilasa (PYGM^{a,b}) (Kubisch, 1998). Nombres de los *primers*, de acuerdo con el exón amplificado [*primers forward* (xf) y *primers reverse* (xr)], secuencias de los *primers* en dirección 5'-3', tamaño de los productos de amplificación en bp (pares de bases), y temperaturas de *annealing* comprobadas para cada uno de los 14 pares de *primers*.

Primers	Secuencia 5'-3'	Producto PCR (bp)	Annealing (°C)
1f 1r	ggc tgg agg cag tgc tga gg gca gcc act taa gtc aag atc g	391	64
2f 4r	tgg gcc tgg ctg agt gtt gg cca gag atg ata aac aag tgg g	598	57
5f 5r	gag ctc ctg act tat act tgg ctc tct gag cct cag cat cc	371	58
6f 7r	taa agc ctt gag tcc cag cc tag ggc acc agc aag tgt cc	457	62
8f 8r	acc cac cgc agc ttt agg cca tgc aga ggc cta gca cac act gtc c	262	66
9f 9r	cat agg gca gtg acc ata gca tgg ctc cca cgc tcc caa act gg	235	65
10f 10r	Ggg atg cgt agt gtg tga gg cga ctc cca ggc cca gac tgg	284	68
11f 11r	ttc ctg ggt ctg gtt cta gc ggg ctt ctg tgt gac aga gg	276	64
12f 12r	ccc ttt cag caa gac acc agg gtg aac cac cta cac gac cat acc	289	62
13f 13r	gct tgg ctg acc tgg aaa tgg cac gcc tga ccc aga cat ctg g	264	63
14f 14r	act gga gtg tgg act gta gg aag tcc aaa gga gat gtt gg	312	60
15f 16r	ctc tgt cag gag cta cta cc aag tat ccc agg aag aga cg	482	62
17f 17r	cca gcc taa tct gag agt cc tgg acc agt ctt tcc aga cg	380	62
18f 20r	gac ctg ggt ttt gac cct gg aga gat cta act cca gta cc	903	55

Tabla 2. Características de los primers utilizados para la amplificación por PCR del gen PYGM

En el estudio de los fragmentos exónicos, cada reacción de 50 µl en un microtubo contiene:

- 5 µl de ADN a 20 ng/µl
- 8 µl de dNTP (*Gibco BRL*) a 1,25 mM
- 5 µl de tampón 10 X (*Gibco BRL*)
- 1,5 µl de MgCl₂ (*Gibco BRL*) (1,5 mM final)
- 5 µl de *primer forward* a 2 µM
- 5 µl de *primer reverse* a 2 µM
- 20 µl de agua bidestilada
- 0,5 µl de Taq Polimerasa (*Gibco BRL*) (5 unidades/µl).

La reacción PCR se realizó de acuerdo con los protocolos estándar y las instrucciones del fabricante en un Termociclador *PE 9700* (*Perkin Elmer, California*):

Condiciones de la PCR:

- 200 ng de ADN genómico fueron amplificados mediante 5 minutos de desnaturalización a 94°C, y luego:
 - 35 ciclos de: $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ segundos de desnaturalización a } 94^{\circ} \text{ C} \\ 30 \text{ segundos de } \textit{annealing} \text{ entre } 55^{\circ} \text{ C y } 59^{\circ} \text{ C} \\ 1 \text{ minuto de extensión a } 72^{\circ} \text{ C} \end{array} \right.$
 - 5 minutos de extensión final a 72°C

Reacción de Retrotranscripción-PCR (RT-PCR) de obtención del cADN (ADN complementario) del gen de la Miosforilasa.

Se obtienen tres fragmentos: uno de 0,5 Kb (del exon 1 al 3), un segundo fragmento de 1,1 Kb (del exon 3 al 13) y un tercer fragmento de 1,1 Kb (del exon 13 al 20) con el kit de *Takara Biomedicals*:

MATERIAL Y MÉTODOS

Reacción de retrotranscripción (20 µl):

- 3,5 µl de ARN (aproximadamente 1 microgramo)
- 2 µl de mezcla de dNTPs ya preparados del kit (1mM final)
- 2 µl de tampón *RNA PCR buffer* 10 X
- 4 µl MgCl₂ (5mM final)
- 1 µl de *Random 9mers* del kit (0,125 µM final)
- 0,5 µl de inhibidor de la ARNasa (1 unidad/µl)
- 1 µl de Transcriptasa Inversa *Takara* (0,25 unidades/µl)
- 6 µl de agua RNAsa *free*

La reacción tiene lugar bajo el programa del termociclador *PE 9700*:

- 10 minutos a 30°C
- 50 minutos a 42° C
- 15 minutos a 70°C

Una vez finalizada esta reacción se procede a amplificar el cADN específico de la miofosforilasa, también con el kit de *Takara Biomedics*, bajo la reacción (50 µl):

- 10 µl del producto de la retrotranscripción
- 4 µl de tampón *Long PCR Buffer* 10 X
- 3 µl de MgCl₂ (1,25 mM final)
- 5 µl del primer *forward* T3F a 2 pmols/µl
- 5 µl del primer T1R *reverse* a 2 pmols/µl
- 0,25 µl de *Long PCR LA Takara Taq*[®] (5 unidades/µl)
- 21,75 µl agua bidestilada.

La reacción tiene lugar bajo el programa del Termociclador *PE 9700*:

Condiciones de la PCR:

- 2 minutos de desnaturalización a 94°C y
- 35 ciclos de: $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ segundos de desnaturalización a } 98^\circ \text{ C} \\ 11 \text{ minutos de } \textit{annealing} \text{ a } 68^\circ \text{ C} \end{array} \right.$
- 10 minutos de extensión final a 72 °C

Los productos de la reacción de PCR se resuelven en un gel de agarosa (*Bio Rad*) al 1% con tampón 1 X TAE (Tris-Acetato-EDTA), y se visualizan en un transiluminador (*Vilber Lourmat*) gracias al Bromuro de Etidio (*Gibco BRL Life Technologies*) (3 µl de

solución 500 µg/ml per cada 50 ml de gel) incorporado al gel. Si se obtiene la banda del tamaño esperado, se procede a purificar y secuenciar los productos.

Tampones-reactivos utilizados:

Tampón 1 X TAE:

- 4,845 g Tris (*Sigma*)
- 1,64 g NaAc (*Merck*)
- 0,372 g EDTA (*Boehringer Mannheim*)

Enrasar hasta 1 litro con agua destilada

3.2.5.5.- PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Con el objeto de eliminar los restos de reactivos de la PCR que podrían interferir en las secuenciaciones utilizamos el kit de purificación *QUIAquick®* (*Qiagen, Hilden, Alemania*):

- Añadir 200 µl de tampón PB al volumen de producto de PCR (para que el ADN quede ligado a la resina de la columna).
- Pipetear la mezcla en una columna de purificación adaptada a un tubo tipo *Eppendorf*.
- Centrifugar durante 2 minutos a 13500 g.
- Desechar el eluido.
- Añadir 750 µl de tampón de lavado.
- Centrifugar durante 2 minutos a 13500 g y tirar el eluido.
- Repetir el paso de lavado.
- Poner la columna en un tubo tipo *Eppendorf* y pipetear 50 µl de agua autoclavada (o menos si la banda obtenida en la PCR es poco intensa).
- Centrifugar nuevamente para obtener la solución purificada.
- Resolver los purificados en un gel de agarosa al 1 %.

3.2.5.6.- REACCIÓN PCR DE SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Utilizamos el kit ABI PRISM Dye™ *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PE Applied Biosystems, California).

- En un tubo pipeteamos:
 - 5 µl del purificado.
 - 1 µl del *primer* usado en la PCR inicial (*forward* en una reacción y *reverse* en otra reacción, para confirmar) a concentración 2 µM.
 - 4 µl de *mix Big dye*® *Terminator* (PE Applied Biosystems).
- Incubar en el termociclador *Perkin Elmer 9700*:

Condiciones de la PCR:

- 3 minutos de desnaturalización a 94°C, más
- 25 ciclos de: $\left\{ \begin{array}{l} 10 \text{ segundos de desnaturalización a } 96^\circ\text{C} \\ 5 \text{ segundos de } \textit{annealing} \text{ segun } T_m \text{ del } \textit{primer} \text{ (1)} \\ 4 \text{ minutos de extensión a } 60^\circ\text{C} \end{array} \right.$

(1) Temperatura aproximada, resultante de restar 5 grados a la temperatura de *melting* (T_m) del *primer* y lo más próxima posible a la utilizada en la PCR de amplificación.

3.2.5.7.- PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN

Con el objetivo de eliminar los picos terminadores, procesamos los productos de PCR pasándolos por columnas de purificación.

- Centrifugar las columnas de purificación (*Edge Biosystems*) 2 minutos a 720g y descartar el eluido.
- Poner la columna en un tubo tipo *Eppendorf*.
- Pipetear todo el producto.
- Volver a centrifugar 2 minutos a 720 g.

3.2.5.8.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA E INYECCIÓN EN EL SECUENCIADOR

- Pipetear en un microtubo 12 μ l de *Terminator Suppressor Reagent (TSR)* (*PE Applied Biosystems, California*).
- En el mismo tubo pipetear 8 μ l del purificado de producto de secuenciación.
- Desnaturalizar incubando 2 minutos y medio a 95°C (en termociclador).
- Poner rápidamente en hielo y dejarlo reposar unos minutos.
- Poner el tubo en su *rack* del secuenciador *ABI PRISM® 310* (*PE Applied Biosystems, California*) para que la muestra sea inyectada y analizada.

3.2.5.9.- TRATAMIENTO DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se analizó el ADN genómico de todos los pacientes para la búsqueda de la mutación R49X, mediante técnicas de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*). En un volumen total de 20 μ l, 16 μ l de producto PCR utilizando los *primers 1f/1r* fue incubado con 5 U de *NlaIII* (*New England Biolabs*) en el *buffer* proporcionado y 100 μ g/ml BSA a 37°C durante 1 hora. Los productos de digestión se resuelven mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. En condiciones normales (*wild type*), la digestión del fragmento PCR de 475 nucleótidos del exón 1 es digerido por la enzima *NlaIII* en dos fragmentos de 158 nucleótidos y 317 nucleótidos. En presencia de la mutación R49X, el fragmento de 317 nucleótidos genera otros dos (uno de 146 nucleótidos y otro de 171 nucleótidos).

Las otras mutaciones descritas en esta tesis se confirmaron mediante el mismo procedimiento de PCR-RFLP, y para ello se utilizaron los enzimas de restricción apropiados:

- *AvaI, AvaII, BglI, BsrI, HhaI, HaeIII, KspI, MscI, MspI, Nae I, NcoI, NlaIII, StyI*, (*New England Biolabs, Beverly, MA*).
- *MaeI, MaeII, MaeIII, SauI, CfrI* (*Fermentas, USA.*)

La reacción de digestión se realiza según el protocolo e instrucciones del fabricante:

Para preparar la reacción de 30 μ l, se utilizan:

- 20 μ l de solución de ADN (10 μ g)
- 3 μ l de tampón de restricción
- 2 μ l de enzima (10 u/ μ l)
- 1 μ l de ARNasa A (1 u/ μ l) (*Gibco*)
- 4 μ l de agua bidestilada

Incubar la reacción en baño (*B Braun*) a 37° C durante toda la noche.

Inactivar la reacción incubando 20 minutos a 65 °C (baño).

- Tampón 1: Bis Tris Propano HCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 10 mM pH 7,0
- Tampón 4: Acetato potásico 500 mM, Tris acetato 200 mM, Acetato de Magnesio 100 mM,
- DTT 10 mM pH 7,9.

3.3.- METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

La metodología estadística empleada para alcanzar los objetivos propuestos hace referencia a las técnicas descriptivas e inferenciales pertinentes para la investigación.

Los métodos descriptivos utilizados corresponden a:

- Variables cualitativas: tabulación, en particular, proporción de pacientes en cada categoría, y representación gráfica de la información recogida, concretamente gráficos de barras y de sectores.
- Variables cuantitativas: cálculo de los estadísticos adecuados, como media, desviación típica, mediana, y rango.
- También se ha creído conveniente el cálculo de tablas de contingencia entre algunas variables cualitativas o incluso con variables cuantitativas categorizadas. En especial

se ha investigado las dependencias entre el tipo de mutación y las principales variables del estudio.

Las técnicas inferenciales usadas han sido únicamente con el objetivo de la comparación de variables cuantitativas con el factor *sexo*:

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov de ajuste a la distribución normal.
- Test *t* de Student de comparación de medias en poblaciones normales independientes.
- Test no paramétrico *U* de Mann-Whitney.

El nivel de significación empleado ha sido del 0,05.

Aunque también se ha calculado el estadístico χ^2 para todas las tablas de contingencia, éste debe entenderse como un índice y no como una prueba de independencia entre los factores de la tabla. No es posible utilizar la prueba χ^2 de independencia ya que no hay suficientes datos y muchas casillas tienen una frecuencia esperada inferior a 5.

Para el tratamiento informático de los datos se ha utilizado el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences SPSS en su versión 10.0.6 sobre una plataforma Windows XP.

