

IV. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS POR FAMILIAS

FAMILIA PYGM-01

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de una población de la provincia de Jaén. Los padres (casos III: 1 y III: 2) son naturales de Arbuniel, que tiene un censo de 824 habitantes. El abuelo materno es hermano de la abuela paterna.

Estudiamos a los siguientes miembros de esta familia:

III:1, III:2, IV:2, IV:3, IV:4, y IV:7.

El caso índice (IV:3), nacida en Barcelona en 1969, fue remitida para su estudio cuando tenía 24 años. Desde la edad de nueve años tenía dificultades al correr, se le quedaban agarrotadas las piernas con dolores musculares que la obligaban a parar. Sufrió caídas frecuentes debido a las contracturas musculares. A los 18 años empezó a trabajar en una tienda de productos cárnicos. Cuando apretaba fuerte las tijeras para cortar piezas de carne, se le quedaban las manos agarrotadas. Como consecuencia de la persistencia de las molestias fue diagnosticada e intervenida de tendinitis, teniendo que abandonar su trabajo al no presentar ninguna mejoría tras la intervención.

En diversas ocasiones le habían detectado cifras elevadas de CK séricas. No recuerda episodios de mioglobinuria. En la actualidad evita correr, subir más de tres pisos, y llevar pesos. Al andar distancias largas, si aparecen síntomas de dolor, descansando 5 minutos puede reanudar de nuevo el paseo.

La paciente se ha visto forzada a adaptar su estilo de vida a las limitaciones causadas por la intolerancia al ejercicio. Trabaja en la actualidad en un comercio propio, evitando realizar todas aquellas actividades que le producen los síntomas.

En la exploración física, la fuerza muscular, reflejos, sensibilidades y el resto de la exploración eran normales. La tensión arterial era 125/65 mm Hg. La frecuencia

RESULTADOS

cardíaca en reposo era de 60 ppm. Su peso era de 82.0 Kg. y la talla de 164,0 cm. En la exploración neurofisiológica, el EMG mostraba un patrón miopático y las velocidades de conducción nerviosa eran normales. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En test de la isquemia, podía aguantar el ritmo durante 42 segundos. En ese momento la mano quedó contracturada, siéndole imposible abrir los dedos de la mano.

Los niveles basales de CK eran de 2043 UI/L, aunque había llegado a 9341 UI/L. Otras enzimas elevadas fueron la AST 88 UI/L y la ALT de 76 UI/L. El resto de determinaciones estaban dentro de los valores de la normalidad.

En el test del ejercicio isquémico no se observó elevación de lactato ni de piruvato, siendo normal la curva de amoniaco. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,46	0,40	0,50	0,35	0,35	0,35
Piruvato	0,14	0,14	0,18	0,12	0,10	0,10
Amoniaco	28,8	88,6	124,2	88,8	48,6	30,0

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de fibras musculares de tamaño y forma irregular. En algunas zonas había aumento del tejido endomisial. En casi todos los fascículos se distinguía alguna fibra necrótica. De forma ocasional, se observó alguna vacuola subsarcolémica. Con la técnica de PAS fue difícil valorar si estos acúmulos eran PAS positivos. Con la tinción de la fosfatasa ácida, se observó que las zonas subsarcolémicas eran positivas. En la reacción histoquímica para la miofosforilasa no se observó tinción de las fibras musculares.

La hermana más pequeña (IV:7), que en la actualidad tiene 24 años de edad, fue también estudiada a los 16 años por referir dolores musculares, intolerancia al ejercicio y cansancio desde los 7 años. Estas molestias eran especialmente fáciles de provocar cuando subía escaleras, corría, hacía gimnasia escolar, nadaba o practicaba cualquier

deporte. En una ocasión, cuando tenía 14 años, tras un ejercicio intenso presentó un cuadro brusco de pérdida de conciencia de 2 minutos de duración, sin pérdida del control de esfínteres. Tampoco recuerda haber tenido episodios de mioglobinuria, pero al igual que su hermana mayor, si descansa durante 10-15 minutos en el instante en que aparecen las molestias musculares, puede reanudar sin problemas el ejercicio.

Su peso era de 67,0 kg y la talla de 163,0 cm. En la exploración física, la fuerza muscular era normal. No se observaron otras alteraciones en la exploración neurológica. En el test de la isquemia, aparecían contracturas musculares a los 38 segundos. Tras realizar 12 ejercicios de ponerse en cuclillas y levantarse, la frecuencia cardiaca se incrementó de 60 ppm a 115 ppm y la frecuencia respiratoria se duplicó.

En el EMG realizado durante el ingreso para estudio de su episodio sincopal, no se observó actividad fibrilar en reposo, miotonía ni contracturas. Tanto los patrones de actividad voluntaria como el análisis automático (T/A), eran compatibles con una afección miopática evolucionada o de cierta cronicidad.

Las CK en reposo eran de 1.097 UI/L (aunque en ocasiones los valores fueron de 2912 UI/L). La AST era de 290 UI/L, la ALT de 61 UI/L, siendo normales el resto de los parámetros estudiados.

En el test de la isquemia apareció contractura de la mano a los 38 segundos. La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,80	0,60	0,68	0,72	0,69	0,69
Piruvato	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05
Amoniaco	44,0	275,7	165,0	111,1	54,8	45,1

Trabaja como dependienta, con contratos eventuales en diferentes empresas que no son renovados debido a su bajo rendimiento físico. Si intenta esforzarse aparecen palpitaciones y sensación de ahogo.

Otra hermana (caso IV:2), de 35 años, se queja de agujetas, mialgias e intolerancia al ejercicio desde la edad de 14 años. No ha tenido ningún episodio de pigmenturia,

RESULTADOS

aunque sí tuvo un cólico nefrítico a la edad de 33 años. Trabaja como enfermera, y puede realizar la mayoría de tareas que requiere su profesión.

La exploración física era anodina. El peso era de 72,0 kg., la talla de 160,0 cm, la tensión arterial de 130/85 y la frecuencia cardiaca de 70 ppm. En el test de la isquemia, aguantó 36 segundos. En ese momento la mano se le quedó agarrotada.

Las CK eran de 3131 UI/L, la AST de 258 UI/L, la ALT de 54 UI/L y el ácido úrico de 3,4 mg/dL. La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,70	0,64	0,70	0,58	0,56	0,50
Piruvato	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,02
Amoniaco	44,6	304,6	71,8	69,5	52,9	40,6

Otra de las hermanas (IV:4), que tiene 31 años, aqueja mialgias y calambres desde la edad de 21 años, coincidiendo con el embarazo de su primer hijo. La aparición de las molestias está relacionada con ciertas actividades, especialmente al correr, saltar en cuclillas, nadar, colgar los platos, trabajar con los brazos en altos, limpiar cristales levantar en hombros a sus hijos o llevar pesos. Se le quedan agarrotadas las manos al cortar con tijeras. Trabaja en una pollería y tiene grandes problemas en su puesto de trabajo. No ha tenido episodios de pigmenturia.

Refiere taquicardias durante la realización de ejercicios moderados. Después de realizar 20 flexiones en cuclillas, la frecuencia cardiaca aumentó de 74 ppm a 135 ppm. Este incremento de la frecuencia cardiaca se acompañó de disnea y de un aumento desproporcionado en la frecuencia respiratoria. El balance muscular era normal, así como el resto de la exploración física. El peso era de 70 kg, la talla 163,0 cm y la tensión arterial de 110/85 mm. Hg. En las analíticas, la concentración de CK era de 1.640 UI/L, la AST de 69 UI/L y la ALT de 44 UI/L.

En el test del ejercicio isquémico del antebrazo, aparecía contractura de la mano a los 52 segundos. Los valores obtenidos fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,58	0,72	0,70	0,74	0,70	0,70
Piruvato	0,07	0,08	0,10	0,09	0,08	0,06
Amoniaco	26,7	71,0	87,5	34,1	39,1	25,9

La madre (caso III:2), que ahora tiene 67 años, recuerda que desde la edad de 15 años siempre ha precisado tomar analgésicos debido a las frecuentes mialgias y contracturas musculares. No pudo nunca correr ni andar deprisa por cansancio e intolerancia. No ha presentado episodios de mioglobinuria ni refiere fenómeno sugestivo de *second wind*.

En los análisis de rutina se le han detectado repetidamente alteraciones en los valores de las transaminasas (AST 93 UI/L y ALT 84 UI/L) con negatividad para los marcadores serológicos de hepatitis víricas. También el ácido úrico estaba discretamente elevado (5,8 mg). La exploración física no reveló alteraciones neurológicas significativas. Su peso era de 119,0 Kg., la talla de 154 cm, la tensión arterial de 160/100 y la frecuencia cardiaca de 68 ppm.

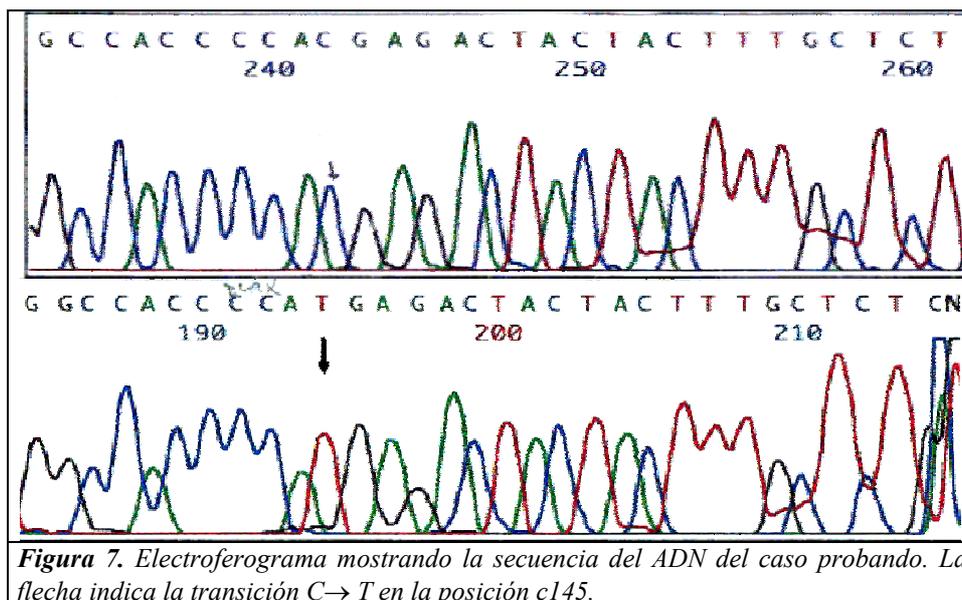
Las CK fueron normales de 100 UI/L. Realizamos una curva de lactato, que mostró una elevación mínima. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	1,16	0,86	1,47	0,46	0,85	0,91
Piruvato	0,09	0,10	0,09	0,09	0,09	0,08
Amoniaco	35,6	82,4	103,5	68,1	49,4	37,2

El padre (caso III:1), fallecido por edema agudo de pulmón a los 71 años, no refería ninguna de las molestias musculares presentes en la mayoría de miembros de la familia. La exploración neuromuscular, el test de la isquemia y la curva de lactato, practicados cuando tenía 68 años, fueron normales.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, identificó la mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una

citocina es substituida por timina (C→T). Como consecuencia de esta transición la arginina codificada por el codón CGA cambia a un codón stop (TGA) (Figura 7). La mutación se confirmó usando el *primer reverse* 1R. La arginina en la posición 49 es un aminoácido altamente conservado en diferentes especies (Figura 8).



Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RCLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *Nla*III (New England Biolab, Beverly, MA) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en dos fragmentos, uno de 146 pb y otro de 171 pb.

El análisis RLFP confirmó que el caso probando (IV:3) y sus hermanas (IV:2, IV:4 y IV:7) eran portadores de la mutación R49X en estado homocigoto, mientras que el padre (del que disponíamos ADN) y la madre, eran portadores heterocigotos.

<i>AA posición</i>	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
<i>Patient R49X</i>	R	N	V	A	T	P	X	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Humana</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Bovina</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Conejo</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Ovina</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Raton</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>B-Humana</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	F	A	L	A
<i>L-Humana</i>	R	N	V	A	T	T	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>Drosófila</i>	R	N	V	A	T	L	R	D	Y	Y	A	L	A

Figura 8. Arginina 49: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 43 a 55). M= muscular. L= hepática. B= cerebral.

FAMILIA PYGM-02

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la figura 1. La familia es originaria de una población de la provincia de Córdoba. Los padres (III:1 y III:2), son originarios de la misma población, Hinojosa del Duque, un pequeño pueblo de Córdoba que tiene, en la actualidad, censados unos 7.813 habitantes. Hay consanguinidad en esta familia: la abuela materna (II:3) y la abuela paterna (II:3) eran hermanas.

En esta familia estudiamos a 3 miembros:

III:1, III:2 y IV:3.

El caso probando índice (IV: 3), nacida en Barcelona en 1972, es la tercera de cuatro hermanos. Fue remitida inicialmente a nuestro Hospital para estudio de dolor abdominal en fosa ilíaca derecha de tres años de evolución, cuando tenía 27 años. En sus dos

RESULTADOS

ingresos, la causa de las molestias abdominales quedó sin un diagnóstico claro, sugiriéndose las posibilidades de: pielonefritis, infección urinaria secundaria a cristaluria, quiste folicular ovárico o dolor abdominal inespecífico. En las analíticas, se detectaron repetidamente cifras de CK elevadas, que oscilaban en reposo entre valores de 848 a 13345 UI/L. Al alta hospitalaria, fue solicitada una valoración a nuestra Unidad de Patología Neuromuscular. La anamnesis puso de manifiesto que ya de pequeña (a los 8 años), se cansaba al realizar ejercicios físicos, sobre todo al correr, practicar deportes, subir escaleras o andar distancias largas (superiores a 1000 m). Había tenido dos episodios de mioglobinuria coincidiendo con ejercicios agotadores. Tenía dolores musculares de predominio en piernas y pared abdominal. En los últimos cinco años, nota que tras llevar pesos con los brazos, secarse el cabello o subir escaleras de 4 pisos, aparecen contracturas en los brazos o pantorrillas.

Cuando aparecían los primeros síntomas, si descansaba durante unos 5 minutos, después podía reanudar la actividad. Durante las actividades intensas aparecían crisis de taquicardias (hasta 190 ppm). Desde entonces, ha adaptado su ritmo de vida a las limitaciones que la enfermedad le condiciona.

En la exploración física, tanto la fuerza muscular como el volumen y la consistencia de los músculos eran normales. En el resto de la exploración física no había alteraciones significativas.

La tensión arterial era 115/60 mm Hg. y la frecuencia cardiaca en reposo de 66 ppm. El peso era de 57 Kg y la talla de 164,0 cm.

En la exploración neurofisiológica, la neurografía motora y sensitiva, así como la respuesta F fueron normales. El estudio EMG fue estrictamente normal, salvo algunas zonas del músculo vasto interno derecho, en las que se observaba un discreto aumento de polifásicos breves con una discreta desviación en el análisis automático. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 39 segundos.

Los niveles de CK en suero eran de 2363 UI/L. Otras enzimas elevadas fueron la AST 54 UI/L y la ALT 55 UI/L. Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del lactato no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,91	0,67	0,77	1,00	1,07	0,88
Piruvato	0,10	0,11	0,12	0,11	0,10	0,09
Amoniaco	38,5	93,6	114,2	85,8	50,4	40,0

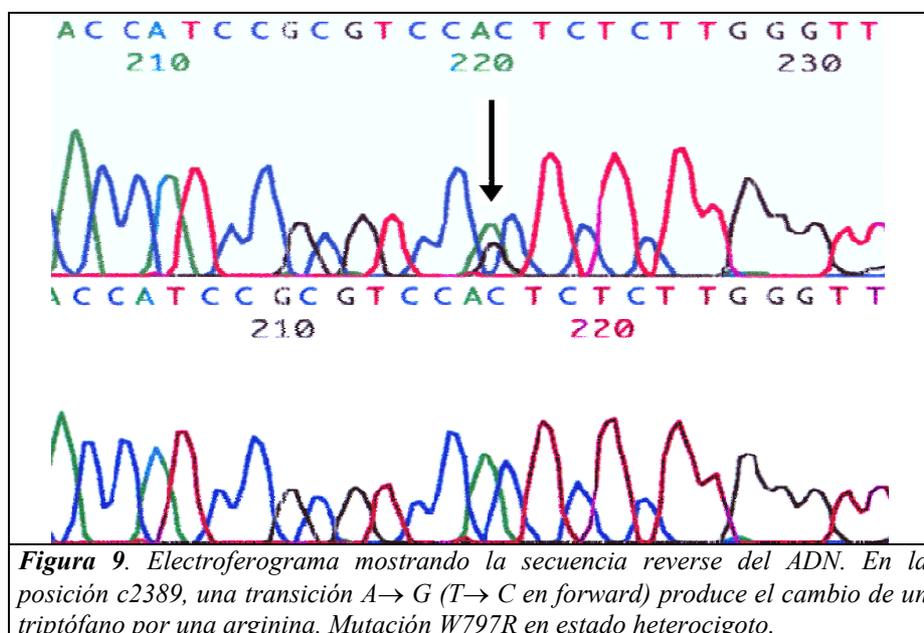
Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de numerosas fibras con vacuolas subsarcolémicas, la mayoría eran PAS positivas. La tinción con miofosforilasa era negativa.

Tanto la madre (III: 2) de 50 años como el padre (III:1) de 60, gozan de buen estado de salud, están libres de síntomas musculares y tanto la exploración neurológica como los niveles de CK son normales. Ninguno de los hermanos del caso probando, un varón de 30 años (IV:1), una mujer de 28 años (IV:2) y la hermana pequeña de 24 años (IV:4), se quejan de molestias musculares o intolerancia al ejercicio.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió la presencia de la mutación **puntual missense (W797R)** en el exón 20, en la posición c2389, por la que una transición T→ C cambia un **TGG** (triptófano) por una **CGG** (arginina) (*Figura 9*). Para detectar la mutación T→ C en el exón 20, diseñamos una PCR-RFLP. Un fragmento PCR fue amplificado a partir del ADN genómico, usando el *primer forward* 5'-TTGTACAAGGTGAGGGGTCCT-3' y luego un *primer reverse mismatched* 5'-TTGCCAGAGGTGGCGATGTTTCCTTATCACCATCCGCGTGC-3' (en negrita el nucleótido *mismatched*)

El fragmento 174 pb obtenido, fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *HhaI* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de agarosa al 2,5%. En presencia de la mutación, la enzima corta el fragmento de 174 pb

en dos, uno de 135 pb y otro de 39 pb, mientras que en el ADN normal el fragmento permanece sin cortar.



Esta mutación fue detectada en estado homocigoto en el caso probando (IV:3) y en estado heterocigoto en sus padres (III:1 y III:2).

FAMILIA PYGM-03

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de dos pequeñas poblaciones de la provincia de Orense. La madre (I:2) fallecida, era natural de Vilaboa, una de las 29 parroquias agrupadas en el ayuntamiento de A Veiga (Orense), que tiene censados 1.748 habitantes. El padre (I:1) era de Paradela, un pequeño núcleo de población integrado con otros 27 en el ayuntamiento de O Bolo (Orense), que tiene 1.655 habitantes.

Las poblaciones de origen de los padres están separadas por una distancia de 6 km. No pudimos demostrar consanguinidad mediante la información obtenida a partir del árbol genealógico familiar, que comprendía cuatro generaciones anteriores a la del caso probando.

El caso probando (II:8), nacido en Vilaboa en 1953, acudió a Urgencias de nuestro Hospital cuando tenía 39 años por cuadro de dolor precordial y disnea de esfuerzo en el contexto de una miocarditis. En las analíticas de urgencias se detectaron cifras elevadas de CK (3.555 UI/L), que inicialmente fueron interpretadas como signo de insuficiencia cardiaca, lo que motivó el ingreso para su estudio. Tanto la ventriculografía isotópica como la gammagrafía cardiaca fueron normales.

Desde la edad de 6 años, tenía intolerancia al ejercicio, mialgias y contracturas musculares desencadenadas por actividades como: correr, hacer gimnasia, subir escaleras y llevar objetos pesados. Recuerda al menos 4 episodios de mioglobinuria tras esfuerzos intensos. Cuando aparecían los primeros síntomas, si paraba durante unos 10 minutos, podía reanudar la actividad. Durante las actividades intensas, aparecían crisis de taquicardias (hasta 180 ppm). Desde entonces, el paciente se ha visto forzado a adaptar su estilo de vida a las limitaciones causadas por la intolerancia al ejercicio, aunque puede gestionar el negocio familiar.

La exploración neurológica era normal. La tensión arterial era 140/70 mm Hg y la frecuencia cardiaca en reposo era de 69 ppm. El peso era de 83 Kg. y la talla de 167,0 cm.

En la exploración neurofisiológica, la neurografía motora y sensitiva eran normales. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular. Sólo en el músculo cuádriceps derecho, en el EMG convencional se encontraron signos compatibles con cambios miopáticos, y en el análisis automático, una tendencia a la desviación miopática.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 47 segundos. En ese momento la mano quedó contraída y dolorosa, siéndole imposible abrir los dedos de la mano.

Los niveles de CK en suero eran de 461 UI/L. Otros parámetros elevados fueron: ALT de 43 UI/L y ALT 41 UI/L. El ácido úrico era de 8,0 mg/dl. Tanto el hemograma como

RESULTADOS

el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales. La función tiroidea era normal.

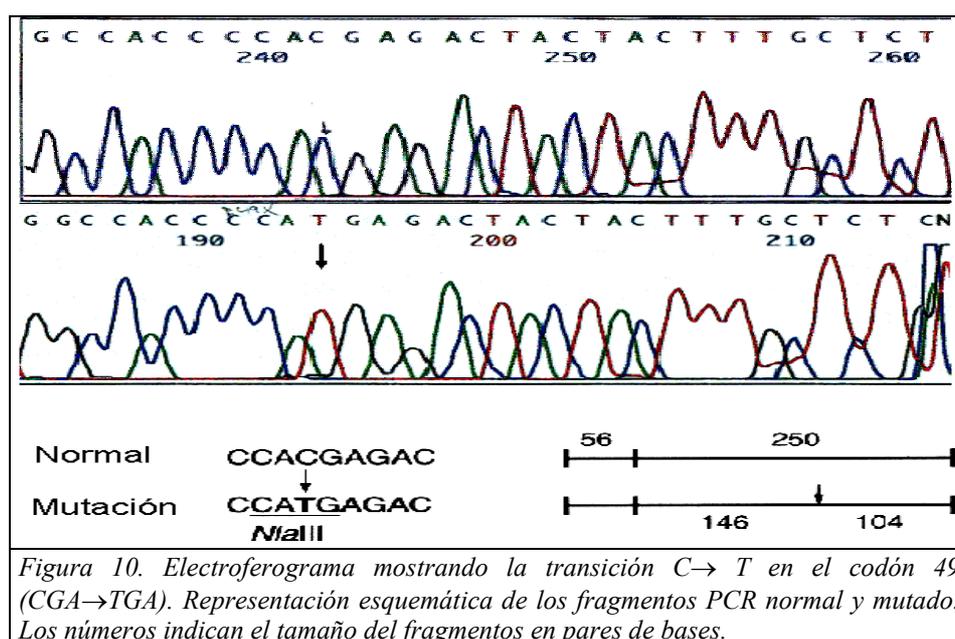
En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,89	0,70	0,89	0,83	0,90	1,00
Piruvato	0,02	0,06	0,05	0,05	0,03	0,05
Amoniaco	29,0	390	238	142	93	32

Se realizó una biopsia muscular, mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto, en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de variabilidad en el tamaño de las fibras, alguna de ellas con forma redondeada. La característica más llamativa fue la presencia de vacuolas, generalmente subsarcolémicas, vacías o conteniendo glucógeno. La tinción con miofosforilasa fue negativa. Algunas fibras tenían además acúmulos de mitocondrias.

Los hijos del caso probando, un joven de 14 años (III: 5) y una niña de 11 años (III: 6), no refieren molestias musculares.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió la presencia de la mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una citosina es substituida por timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el trinucleótido **CGA** cambia a un codón stop (**TGA**) (*Figura 10*).



Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *Nla*III (New England Biolab, Beverly, MA) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales, la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en dos fragmentos, uno de 146 pb y otro de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado homocigoto en el caso probando (II:8).

FAMILIA PYGM-04

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de una pequeña población de la provincia de Granada. Los padres (casos I:1 y I:2) proceden de la misma población, El Turro, un pequeño pueblo integrado en el municipio de Cacín, que tiene censados 736 habitantes. No pudimos demostrar consanguinidad mediante la entrevista. Obtuvimos información

RESULTADOS

de miembros del pedigrí pertenecientes a tres generaciones anteriores a la del caso probando.

Estudiamos a 2 individuos de esta familia: II:5 y II:7.

El caso índice (caso II: 5), nacido en El Turro (Granada) en 1967, fue estudiado cuando tenía 18 años por presentar intolerancia al ejercicio. Recuerda que desde la edad de ocho años, cada vez que hacía una carrera, jugaba a fútbol o hacía algún esfuerzo físico, presentaba mialgias, contracturas musculares y cansancio que le obligaban a parar. Cuando hacía una carrera de velocidad de tan solo 50 metros, tenía además vómitos. A la edad de 13 años, cada vez que había que ir a los olivares para recoger aceitunas, tenía vómitos, mareos y sensación de pérdida de consciencia cuando sólo había andado una distancia de 1 km.

Cada vez que se esforzaba notaba palpitations y sensación de falta de aire. En una de las ocasiones alcanzó las 220 pulsaciones por minuto.

Ya de mayor, recuerda que tuvo que ayudar a empujar el coche de un amigo para ponerlo en marcha y estuvo con contracturas y dolores durante dos días. A veces, estas molestias podían durar hasta tres días. En la actualidad no tolera actividades como subir más de dos pisos, pintar el techo, agacharse mas de ocho veces, andar distancia superiores a 250 metros, caminar deprisa, correr o colgar una lámpara de techo.

Ha tenido 1-2 episodios anuales de pigmenturia, siempre tras esfuerzos físicos medianamente intensos. Observa una cierta mejoría, si al aparecer el primer síntoma de cansancio descansa unos minutos, aunque el tiempo preciso para la fase de adaptación del *second wind* es variable de acuerdo con las características de cada ejercicio. A veces precisa 5-10 minutos, otras, media hora, como ocurrió a la edad de 13 años al ir a recoger aceitunas.

En los últimos años, ha adaptado su estilo de vida a las limitaciones físicas de su enfermedad. A la edad de 34 años, le fue concedida la invalidez para su profesión

habitual (trabajaba en una línea de producción de cables eléctricos, en la que tenía que realizar esfuerzos físicos). Sabe que debe evitar correr, andar más de 200 metros, subir más de 20 escalones, subir rampas y no llevar objetos con los brazos.

La exploración neurológica fue normal. La tensión arterial era 130/70 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 52 ppm. Su peso era de 80,0 Kg. y la talla de 178 cm. En la exploración neurofisiológica, se observó una estricta normalidad de los parámetros electroneurográficos motores y sensitivos. El EMG mostraba signos miopáticos difusos con actividad espontánea y PUM de características miógenas. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En el test de la isquemia, podía aguantar el ritmo durante 31 segundos. En ese momento la mano quedó agarrotada, siéndole imposible abrir los dedos de la mano.

Los niveles de CK en suero, eran en reposo de 4.548 UI/L, aunque en uno de los episodios de pigmenturia presentó cifras de 6.900 UI/L. Otros parámetros alterados fueron: AST de 127 UI/L, ALT de 90 UI/L, LDH de 373 UI/L y ácido úrico de 8,2 mg/dL. El resto de parámetros estudiados estaban dentro de los valores normales.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,81	0,68	0,86	1,01	0,77	0,85
Piruvato	0,06	0,05	0,06	0,04	0,04	0,06
Amoniaco	33,6	341,3	172,0	84,6	77,5	51,2

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de un músculo constituido por fibras de tamaño y forma irregulares, existiendo algunas bastante pequeñas formando grupos de 5-8 fibras. Se observó la presencia de núcleos centrales. También se apreciaron numerosas figuras de necrosis, miofagia y degeneración, en

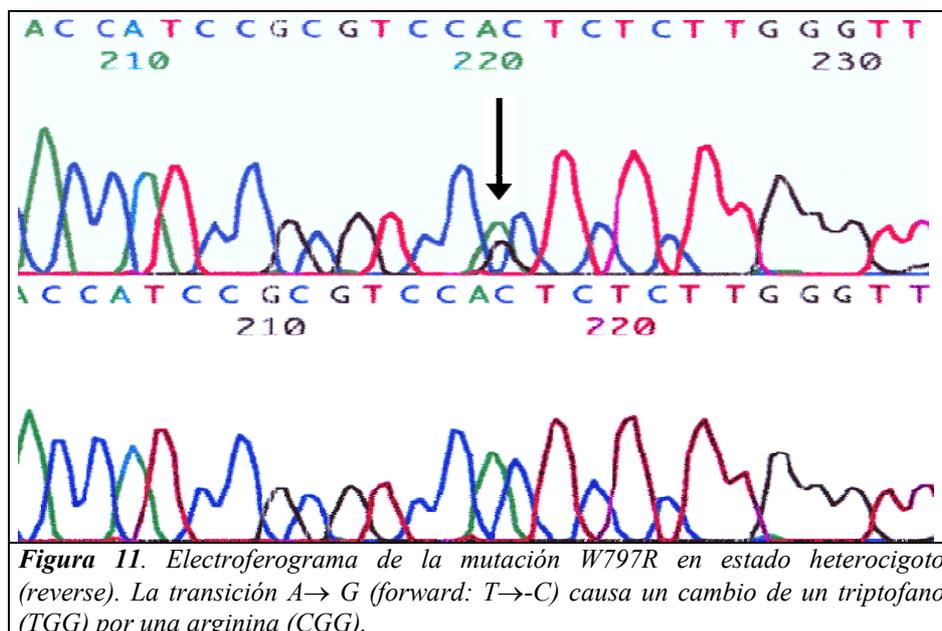
RESULTADOS

diversos estadios. En la tinción de HE se observaba un número relativamente importante de fibras (20-30% aproximadamente) con vacuolas subsarcolémicas redondeadas. La tinción con miofosforilasa era negativa.

Uno de sus hermanos (II:7), de 28 años, presenta síntomas similares a su hermano desde los 9 años. Mide 176,0 cm y pesa 78,0 kg. Recuerda haber tenido alrededor de 16 episodios de mioglobinuria y taquicardia después de ejercicios intensos. En las analíticas, las CK eran de 2.975 UI/L, las ALT de 80 UI, la AST de 41 UI/L y el ácido úrico de 77,6 mg/dL. y CK elevadas. Su second wind es de 5 minutos. Durante el test del ejercicio isquemia presentó contractura en la mano en el segundo 42. Los valores de lactato, piruvato y amoníaco fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,80	0,78	0,82	0,84	0,80	0,78
Piruvato	0,05	0,06	0,06	0,06	0,04	0,06
Amoniaco	39,8	263,8	172,6	92,4	70,6	40,9

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar en esta familia, la **mutación puntual missense (W797R)** en el exón 20, en la posición c2389, por la que una transición T→C cambia un **TGG** (triptófano) por una **CGG** (arginina) (*Figuras 11 y 12*). Para detectar la mutación T→C en el exón 20, diseñamos una PCR-RFLP. Un fragmento PCR fue amplificado a partir del ADN genómico, usando el *primer forward* 5'-TTGTACAAGGTGAGGGGTCCT-3' y luego un *primer reverse mismatched* 5'-TTGCCAGAGGTGGCGATGTTCCCTATCACC ATCCGCGTGC-3' (en negrita el nucleótido *mismatched*)



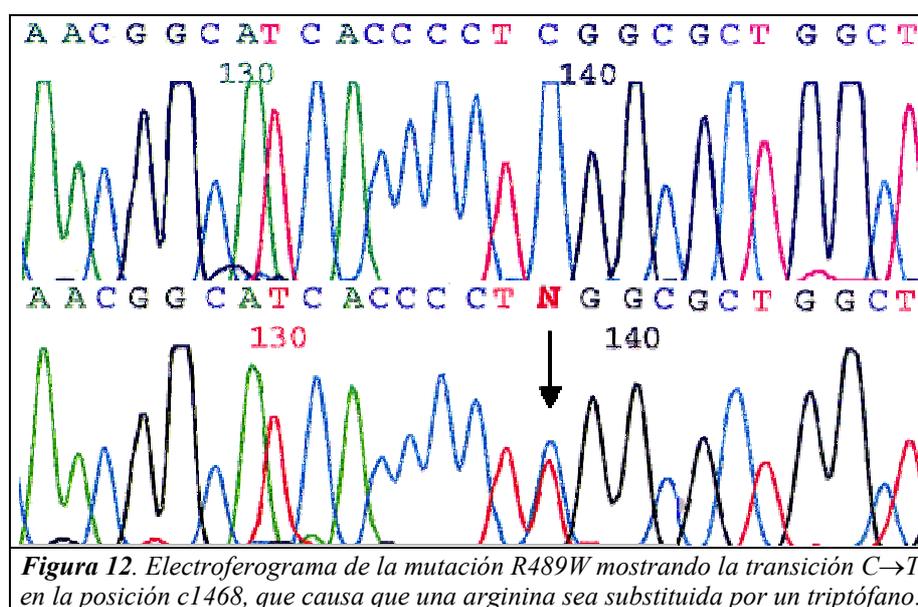
AA posición	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802
Paciente W797R	L	Y	K	N	P	R	E	R	T	R	M	V	I
M-Humana	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
M-Bovina	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
M-Conejo	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
M-Ovina	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
M-Raton	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
B-Human	L	Y	R	N	P	K	E	W	T	K	K	V	I
L-Human	L	Y	M	N	P	K	A	W	N	T	M	V	L

Figura 12. Triptofano 797: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 790 a 802). **M**= muscular. **L**= hepática. **B**= cerebral.

El fragmento 174 pb obtenido fue sometido, a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *HhaI* (New England Biolab, Beverly, MA) y analizado en un gel de agarosa al 2,5%. En presencia de la mutación, la enzima corta el fragmento de 174 pb

RESULTADOS

en dos, uno de 135 pb y otro de 39 pb, mientras que en el ADN normal el fragmento permanece sin cortar. El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar una nueva mutación en esta familia: **una mutación puntual missense (R489W)** en el exón 12, en estado heterocigoto en la posición c1468, en la que una arginina es substituida por un triptofano (C→T). Como consecuencia de esta mutación la arginina codificada por el trinucleótido CGG cambia a un triptofano (TGG=UGG). (Figuras 12 y 13)



AA position	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494
Paciente	K	T	N	G	I	T	P	W	R	W	L	V	L
M-Humana	K	T	N	G	I	T	P	R	R	W	L	V	L
M-Bovina	K	T	N	G	I	T	P	R	R	W	L	V	M
M-Conejo	K	T	N	G	I	T	P	R	R	W	L	V	L
M-Ovina	K	T	N	G	I	T	P	R	R	W	L	V	M
M-Ratón	K	T	N	G	I	T	P	R	R	W	L	V	L
B-Humana	K	T	N	G	I	T	P	R	R	W	L	L	L
L-Humana	K	T	N	G	I	T	P	R	R	W	L	L	L

Figura 13. Arginina 489: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 482 a 496). **M**= muscular. **L**= hepática. **B**= cerebral.

FAMILIA PYGM-05

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de la provincia de Barcelona. El padre (II: 1), aunque nacido en Santa Coloma de Gramanet (municipio de provincia de Barcelona con 112.992 habitantes), tiene sus orígenes por línea paterna (I:1) en la ciudad de Castellón de la Plana (147.667 habitantes), y en la ciudad de Murcia (370.745 habitantes) por línea materna (I:2).

La madre (II:2), es originaria de la ciudad de Barcelona y sabemos que sus padres (I:3 y I:4) eran primos.

Estudiamos a 2 miembros de esta familia:

III:1 y III:3

El caso índice (III:1), nacida en Santa Coloma de Gramanet (Barcelona) en 1955, fue remitida para su estudio cuando tenía 46 años. Ella sitúa el inicio clínico de su intolerancia al ejercicio a la edad de 35 años, con dificultades para subir escaleras, correr, llevar peso en brazos, abrir/cerrar la cafetera o tender la ropa. Las molestias musculares pueden durarle hasta 1 día. Si descansa cinco minutos al presentar las primeras molestias puede continuar la actividad. No recuerda haber tenido ningún episodio de mioglobinuria.

Actualmente, trabaja en la confección como planchadora industrial, y se queja de dolores musculares en los brazos, precisando reiterados descansos en la jornada laboral. El tiempo medio de su *second wind* es de 5 minutos.

El balance muscular y el resto de exploración neurológica era normal. La tensión arterial era 135/85 mm Hg. La frecuencia cardíaca en reposo era de 86 ppm. Su peso era de 61,0 Kg. y la talla de 163,0 cm. En la exploración neurofisiológica, los parámetros neurográficos eran estrictamente normales. En el EMG, mostró escasa actividad espontánea solo en el bíceps. Durante el máximo esfuerzo, se observaron patrones de

RESULTADOS

activación interferenciales, de características miógenas en la musculatura proximal de las extremidades superiores. El análisis automático (*turns amplitude*) mostró una tendencia miopática en deltoides y tibial anterior. El análisis cuantitativo de unidades motoras en el bíceps braquial, mostró una disminución de la duración media de los potenciales de unidad motora. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 42 segundos. En ese momento la mano quedaba contracturada, siéndole imposible extender completamente los dedos de la mano.

Los niveles de CK en suero eran de 885 UI/L, aunque en ocasiones se alcanzaron valores de 972 UI/L. Tanto el hemograma como el resto de parámetros bioquímicos estaban dentro de los valores de la normalidad.

En el test del ejercicio isquémico, no se observó elevación de lactato ni de piruvato, siendo la curva de amoníaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,93	0,70	0,70	0,93	0,70	0,70
Piruvato	0,09	0,09	0,08	0,07	0,08	0,07
Amoníaco	14,6	85,5	106,7	33,8	19,3	10,7

En la biopsia muscular, realizada en el músculo bíceps del brazo izquierdo, se observó una desigualdad en el tamaño de las fibras, presencia de núcleos centrales aislados y múltiples vacuolas pequeñas con localización preferentemente subsarcolémica. Las vacuolas y algunas áreas de las fibras eran PAS positivas. La tinción con miofosforilasa fue negativa.

Su hermano (III:3), de 39 años de edad, fue estudiado como consecuencia de la entrevista con el caso probando, interrogando sobre otros posibles miembros de la familia sospechosos de estar afectados. Accedió voluntariamente a la entrevista, exploración física, curva de lactato y determinaciones bioquímicas/moleculares. Aunque

no había acudido a su médico de cabecera para valorar sus molestias musculares, recuerda que ya a la edad de 8 años, tenía dolores y contracturas musculares durante las actividades deportivas, aunque pudo practicar judo hasta la edad de 16 años y completar el servicio militar. Si en el momento de aparición de las primeras molestias, descansa 5-10 minutos, puede reanudar hasta cierto tiempo la actividad causante de la intolerancia.

En la actualidad trabaja en el mantenimiento de maquinas neumáticas y refiere molestias al coger objetos pesados, agacharse, correr, y al realizar ejercicios que requieren esfuerzo brusco y de forma aguda. Si se esfuerza, las contracturas y dolores musculares pueden durar hasta tres días. En una ocasión ha tenido pigmenturia.

La exploración neurológica no mostró alteraciones significativas. El peso era de 74,5 Kg. y la Talla de 174,0. La frecuencia cardiaca era de 66 ppm y la Tensión arterial de 125/75 mm Hg. En el test de la isquemia, aparecían contracturas musculares a los 36 segundos. Las CK en reposo eran de 1930 UI/L y el ácido úrico de 7,9 mg/dL. El resto de la analítica era normal.

La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,46	0,70	0,70	0,70	0,46	0,70
Piruvato	0,06	0,07	0,09	0,09	0,07	0,08
Amoniaco	39,4	167,6	71,7	65,9	49,9	38,3

Los estudios moleculares han descartado que el defecto molecular en esta familia sean la mutaciones R49X, G204S ó W797R. Pendiente de secuenciación completa del gen de la miofosforilasa.

FAMILIA PYGM-06

Historia de la familia: características y hallazgos clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La madre (I: 2), fallecida a la edad de 82 años por cardiopatía isquémica, era natural de Granada ciudad (240.661 habitantes) y el padre (I:1), fallecido a los 86 por un AVC, era de Barcelona ciudad (1.503.884 habitantes). La información obtenida por la entrevista no sugería la existencia de una posible consanguinidad en la familia.

El caso probando (II: 2), nació en Barcelona en 1936. Cuando tenía 57 años fue ingresada en otro centro por dolor torácico y palpitaciones, tras una época de estrés físico y mental, coincidiendo con la enfermedad crónica en fase terminal de su padre. Desde hacía dos años presentaba hipertransaminasemia sin filiar. Ya en 1984, había tenido un primer episodio de dolor torácico interpretado como angor, aunque tanto los ECG seriados como la gammagrafía cardiaca con talio durante esfuerzo, no mostraron ningún signo de isquemia. Recuerda que durante la realización de esta última prueba, presentó dolores musculares en ambas piernas y crisis de taquicardia supraventricular de 220 ppm. Debido a la normalidad de las pruebas cardiológicas, se sugirió que el dolor torácico pudiera ser secundario a reflujo por una hernia de hiato. Desde entonces, los dolores precordiales se iban repitiendo una o dos veces al año y cedían con Cafinitrina®.

La anamnesis dirigida reveló que desde la edad de 10 años tenía cansancio fácil, intolerancia al ejercicio y dolores musculares durante ciertas actividades físicas como correr y subir escaleras. Si se esforzaba podía presentar vómitos, hasta el punto de que en la actualidad no puede subir más de 10-12 escalones y solo tolera andar en llano a ritmo suave. No recuerda episodios de mioglobinuria. Aunque el síntoma cardinal para ella siguen siendo los dolores torácicos que presenta desde la edad de 40 años, no se ha demostrado un origen isquémico.

En los últimos ocho años, nota que se le agarrotan las manos al hacer fuerza sostenida, por ejemplo en actividades como limpiar los cristales de la casa, fregar suelos, barrer, planchar, llevar pesos o llevar la bandeja de comida desde la cocina al comedor sostenida con una sola mano. También tiene contracturas en las pantorrillas al andar

mas de 500 metros o al subir una cuesta. Si se esfuerza e intenta proseguir el ejercicio en el momento que aparecen las contracturas y los dolores, aparecen taquicardias, disnea y vómitos.

Por el contrario, si en el momento en que aparecen los primeros síntomas, descansa 10-15 minutos, puede continuar la actividad durante algún tiempo más.

Desde 1999, la paciente nota un empeoramiento en su intolerancia al ejercicio y aunque puede realizar aquellas actividades domésticas que no requieren esfuerzo, se ha visto forzada a adaptar su estilo de vida.

La exploración neurológica era normal. La tensión arterial era 120/50 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 90 ppm. El peso era de 70,0 Kg y la talla de 158,0 cm.

En la exploración neurofisiológica, la neurografía motora y sensitiva eran normales. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular. Solo en el músculo cuádriceps derecho, el EMG mostró signos compatibles con una miopatía leve, con un moderado empobrecimiento de los patrones de esfuerzo en alguno de los músculos proximales (especialmente rectos anteriores, sobretodo el derecho) y una reducción de la duración media de los potenciales de acción.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 50 segundos. En ese momento, la mano quedó contracturada y dolorosa, siéndole imposible abrir completamente los dedos de la mano.

Los niveles de CK en suero, eran de 891 UI/L (en una ocasión 1114 UI/L). También se detectó una hiperuricemia de 8,8 mg/dL, AST de 68 UI/L y ALT de 56 UI/L. Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del ejercicio isquémico, no se observó elevación en el lactato ni en el piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

RESULTADOS

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	2,07	1,89	1,87	2,15	1,89	2,22
Piruvato	0,08	0,11	0,10	0,09	0,08	0,08
Amoniaco	86,0	100,0	96,0	71,0	65,0	63,0

Se realizó una biopsia muscular, mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de variabilidad en el tamaño de las fibras. Algunas de las fibras presentaban vacuolas subsarcolémicas, que a veces incluían núcleos e incluso alguna fibra presentaba vacuolas de localización central. El contenido de las vacuolas es PAS positivo. Algunas de las vacuolas estaba vacía. La tinción con mifosforilasa era negativa.

Ninguno de los tres hijos (III:1, III:2 y III:3), con edades comprendidas entre 26 y 36 años, presentan síntomas similares a la madre, aunque se quejan de lumbalgias atribuidas a problemas ergonómicos, que ceden con gimnasia. Su hermana menor, de 50 años de edad (II:3) está asintomática. No disponemos de más información.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió la presencia de la mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una citosina es substituida por timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el trinucleótido CGA cambia a un codón stop (TGA). (Figuras 14 y 15)

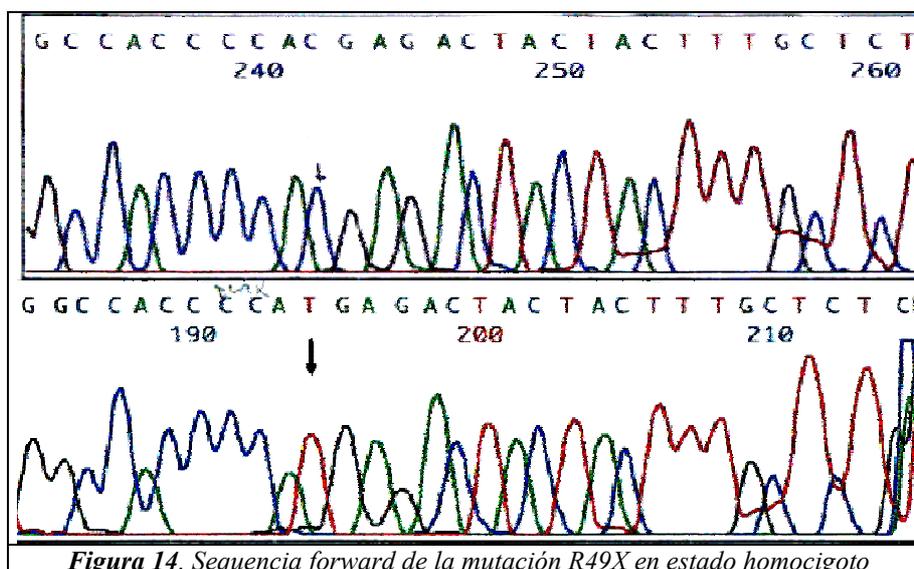


Figura 14. Secuencia forward de la mutación R49X en estado homocigoto

<i>AA posición</i>	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
<i>Paciente R49X</i>	R	N	V	A	T	P	X	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Humana</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Bovina</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Conejo</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Ovina</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>M-Ratón</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>B-Humana</i>	R	N	V	A	T	P	R	D	Y	F	A	L	A
<i>L-Humana</i>	R	N	V	A	T	T	R	D	Y	Y	A	L	A
<i>Drosófila</i>	R	N	V	A	T	L	R	D	Y	Y	A	L	A

Figura 15. Arginina 49: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 43 a 55). **M**= muscular. **L**= hepática. **B**= cerebral.

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales, la enzima corta el fragmento en otros dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en dos, de 146 pb y de 171 pb cada uno.

Esta mutación fue detectada en estado homocigoto en el caso probando (II:2).

FAMILIA PYGM-07

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de una población de la provincia de Córdoba. Tanto la madre (IV:2), fallecida a los 64 años como el padre (IV:1), son originarios de la misma población, Nueva Carteya, un pequeño pueblo de Córdoba que tiene, en la actualidad, censados unos 5.626 habitantes. En esta familia hay consanguinidad, ya que

RESULTADOS

los abuelos de los padres (II:3 y II:8), es decir el abuelo materno de IV:1 era hermano del abuelo materno de IV:2.

Estudiamos a 7 miembros de esta familia:

IV:1, V:2, V:5, V:9, V:11, V:13, V:15; VI:1 y VI:15.

El caso índice (V:5), nacida en Nueva Carteya en 1954, fue remitida para su estudio cuando tenía 34 años. No recuerda ninguna época de su vida que no tuviera síntomas. Desde la infancia, cuando tenía 2 o 3 años, cada vez que realizaba un esfuerzo físico (sin predominancia alguna de músculos) aparecían dolores musculares que le obligaban a interrumpir la actividad.

Más tarde, alrededor de los 20 años, empezó a tener contracturas musculares e hinchazón preferentemente en manos, después de realizar tanto ejercicios intensos como leves, por ejemplo cortar patatas. Desde entonces, nota una progresión de la enfermedad, de manera que los síntomas aparecen al coger la bolsa de la basura, llevar pesos, lavarse el cabello, ducharse, subir 20 escalones, andar deprisa en llano o masticar. No recuerda episodios de pigmenturia.

Cuando aparecían los primeros síntomas, si paraba durante unos 5 minutos, podía reanudar la actividad. Durante las actividades intensas, aparecían crisis de taquicardias (hasta 180 ppm). Desde entonces, refiere un empeoramiento de la enfermedad en la resistencia al ejercicio, en el aumento de actividades que pueden desencadenar los síntomas y en la duración/intensidad de las molestias.

En la exploración física, tenía una debilidad simétrica en el bíceps braquial, deltoides y psoas (4+/5). En los músculos restantes, el balance muscular era normal, así como el resto de la exploración neurológica. La tensión arterial era 120/80 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 72 ppm. El peso era de 68,0 Kg. y la talla de 157,0 cm.

Un estudio EMG inicial, practicado a la edad de 24 años, era normal aunque en una segunda exploración dos años más tarde, se detectaban signos discretos de un proceso

miopático en dos músculos: bíceps braquial y tibial anterior. En el resto de músculos, el trazado continuaba siendo normal. En ambas exploraciones, los parámetros neurográficos eran estrictamente normales. Tampoco se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 36 segundos. En este momento la mano quedó contracturada, siéndole imposible abrir los dedos de la mano, precisando ayudarse con la otra mano. Durante el test, la frecuencia cardiaca basal aumentó de 72 ppm a 148 ppm, y la tensión arterial ascendió a valores de 150/75 mm Hg. Cuando se le pidió que realizase ejercicios de cuclillas, no pudo completar más de 6, debido a la aparición de intensas contracturas musculares en los músculos cuádriceps y paravertebrales, acompañadas de palpitations, taquipnea y sensación prelipotímica. Fue preciso la asistencia de tres personas para ayudarla a incorporarse. En ninguna de las posiciones (sentada, acostada o de pie) la paciente refería mejoría alguna de los síntomas musculares.

Los niveles de CK en suero eran de 379 UI/L. El resto de parámetros estudiados estaban dentro de los valores de la normalidad.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,70	0,65	0,70	0,90	0,70	0,90
Piruvato	0,07	0,07	0,10	0,10	0,10	0,10
Amoniaco	39,1	289,4	117,7	73,9	50,1	42,5

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo derecho, que mostró la presencia de numerosas fibras con vacuolas subsarcolémicas, de distinto tamaño, ocupadas por un material finamente granular o vacías. La mayoría eran intensamente positivas con el PAS, positividad que desaparecía previa digestión con diastasa. Además, había un aumento difuso de la PAS

RESULTADOS

positividad en todo el citoplasma, que desaparecía en parte aunque no en su totalidad con la PAS+ diastasa. La tinción con miofosforilasa era negativa.

Desde entonces, la paciente se ha visto forzada a adaptar su estilo de vida a las limitaciones causadas por la intolerancia al ejercicio. En el aspecto laboral, a la edad de 25 años le fue imposible seguir trabajando como tejedora. Le concedieron una invalidez para su profesión, y debido a la progresión de la enfermedad, le fue ampliada a invalidez absoluta permanente cuando tenía 45 años.

Su hijo (VI:9), de 17 años de edad, no presenta ninguna de los síntomas de la enfermedad.

Su hermana pequeña (V:13), nacida en 1962, fue estudiada como consecuencia de la entrevista con el caso probando, interrogando sobre otros posibles miembros de la familia sospechosos de estar afectados. Accedió voluntariamente a la entrevista, exploración física, curva de lactato y determinaciones bioquímicas/moleculares. Recuerda que a la edad de 12 años ya tenía dolores musculares durante la gimnasia escolar o actividades deportivas. A partir de la edad de 20 años, empezó a notar que aparecían contracturas musculares durante estas actividades. El tipo de actividades que produce la aparición de los síntomas en la actualidad, son: subir 30 peldaños de escalera, subir cuestas, correr mas de 200 m, coger pesos con los brazos, lavar pequeñas prendas de ropa a mano, llevar mas de 5 minutos las bolsas de la compra, nadar, mover muebles, bailar mas de 10 minutos, mascar chicle, secarse el cabello con secador de mano, o peinarse. Si intenta terminar el ejercicio aparecen palpitaciones y disnea. Las contracturas son más frecuentes en la musculatura del cuello, hombros, antebrazos, músculos paravertebrales y pantorrillas. No recuerda episodios de mioglobinuria. Refiere, al igual que su hermana, una progresión de la enfermedad, especialmente en la resistencia al ejercicio, en el aumento de actividades que pueden desencadenar los síntomas y en la duración/intensidad de las molestias.

Trabajó ocho años cosiendo en una cadena de confección, y recuerda que cada dos horas tenía que inventarse una excusa para levantarse del puesto de trabajo e intentar calmar los dolores musculares en la región paravertebral y en las piernas. A la edad de

28 años, le concedieron la invalidez absoluta. Desde entonces, refiere que para andar tiene que ir descansando durante cinco minutos cada 200 metros, aunque el grado de recuperación tras el descanso no es completo.

El balance muscular y el resto de la exploración neurológica fueron normales. El peso era de 60.0 kg. y la talla de 159,0 cm. La frecuencia cardiaca era de 64 ppm y la tensión arterial de 100/60 mm Hg. En el test de la isquemia, aparecían contracturas musculares a los 43 segundos. Tras realizar 13 flexiones en cuclillas, aparecieron palpitations y disnea. La frecuencia aumentó a 120 ppm. La tensión arterial también experimentó un incremento alcanzado valores de 140/65 mm Hg. Las CK en reposo eran de 550 UI/L (En un ocasión alcanzaron valores de 2723 UI/L). El resto de parámetros estudiados estaban dentro de los valores de la normalidad.

La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,84	0,87	0,79	0,75	0,86	0,82
Piruvato	0,10	0,05	0,06	0,08	0,08	0,08
Amoniaco	38,3	137,9	64,2	50,6	50,1	40,1

Su hijo (VI:16) de 12 años, que mide 154,0 cm y pesa 37,0 kg., se queja de molestias musculares al hacer deporte, aunque el balance muscular, los niveles de CK en sangre, el test de la isquemia y la curva de lactato son normales.

El hermano mayor del caso probando (V:2), de 54 años, también refiere intolerancia al ejercicio y dolores musculares desde la edad de 10 años que le obligan a interrumpir la actividad. Al momento de aparecer los primeros síntomas, si descansa unos 10-15 minutos, puede nuevamente reanudar la actividad. Las zonas que se afectan con más frecuencia son: manos, muslos y pantorrillas. Realizó el periodo de instrucción del servicio militar con muchas dificultades. Cumplió el resto de las prestaciones como soldador, destino que permitió que pudiese completar el servicio militar. En el momento actual, no puede subir rampas ni andar más de 800 metros. Si se esfuerza, aparecen palpitations y sensación de falta de aire. A la edad de 47 años, precisó que la empresa

RESULTADOS

donde sigue trabajando (metalúrgica de inyectores) adaptara su puesto de trabajo a las limitaciones que le ocasiona su enfermedad.

El balance muscular y el resto de la exploración neurológica fueron normales. El peso era de 64,0 kg. y la talla de 166,0 cm. La frecuencia cardiaca era de 66 ppm y la tensión arterial de 130/70 mm Hg. En el test de la isquemia, aparecían contracturas musculares a los 41 segundos. Las CK en reposo eran de 1811 UI/L. Otras enzimas alteradas fueron: AST 42 UI/L y ALT 55 UI/L. El ácido úrico era de 7,1 mg/dl. El resto de parámetros estudiados estaban dentro de los valores de la normalidad.

La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,90	0,62	0,71	0,98	0,98	0,83
Piruvato	0,14	0,13	0,13	0,12	0,12	0,11
Amoniaco	52,8	186,8	112,6	72,9	59,8	50,9

Su hija mayor (VI: 1), que ahora tiene 22 años, refiere mialgias desde la edad de 14 años al andar, secarse el cabello y al llevar objetos pesados en brazos. También ciertas actividades domésticas, como fregar el suelo o pasar la mopa, le producen calambres en los brazos. Le es imposible subir más de tres pisos y le cuesta mucho andar rápido durante más de 10 minutos. Trabaja como envasadora, y en una ocasión que la trasladaron a la sección de embalar cajas, tuvo intensos dolores y agarrotamiento en los músculos del antebrazo, precisando guardar reposo durante una semana. No refiere episodios de pigmenturia. Tanto la exploración física, CK, como la curva de lactato fueron normales. Durante el test de la isquemia presentó contractura en la mano a los 49 segundos. Tras realizar 18 flexiones de piernas, la frecuencia cardiaca basal de 88 ppm aumentó a 160 ppm. Esta taquicardia se acompañó de un aumento de la frecuencia respiratoria.

Otro de los hermanos (V:9) de la probando, un varón que ahora tiene 45 años, presenta desde la edad de 10 años mialgias al correr, subir escaleras, llevar pesos en los hombros y al practicar deportes. Debido a su enfermedad, fue eximido de cumplir el servicio

militar. Recuerda que durante los preparativos de su boda, tuvo que pintar el techo de la futura vivienda y estuvo tres días con dolores musculares en brazos y cuello. Un descanso de 10 minutos, es tiempo suficiente para reanudar la actividad en el momento en que aparece el primer síntoma. No recuerda episodios de mioglobinuria.

Trabaja en la actualidad de soldador y no presenta mayores problemas para el ejercicio de su profesión si evita subir escaleras, llevar peso o andar deprisa.

La exploración neurológica no mostró alteraciones significativas. El peso era de 70,0 y la Talla de 162,0 cm. La frecuencia cardiaca era de 68 ppm y la tensión arterial de 140/85 mm Hg. En el test de la isquemia, aparecían contracturas musculares a los 38 segundos. Las CK en reposo eran de 6794 UI/L. Otras alteraciones detectadas fueron: AST de 81 UI/L y ALT de 109 UI/L. La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,61	0,66	0,72	0,88	1,08	0,92
Piruvato	0,15	0,16	0,15	0,14	0,13	0,15
Amoniaco	40,6	186,4	201,4	98,3	55,2	40,1

Otro de los hermanos (V: 11), de 38 años, también refiere intolerancia al ejercicio y dolores musculares desde la edad de 11 años. Fue eximido de cumplir el servicio militar. Subir escaleras, empujar un coche, correr, esprintar, andar por la playa, doblar la cintura, pintar techos, mover muebles, llevar en brazos objetos pesados son algunas de las actividades que recuerda que le provocan la aparición de los síntomas.

El balance muscular y el resto de la exploración neurológica fueron normales. El peso era de 69,0 kg. y la talla de 168,0 cm.

Trabaja en la actualidad de cerrajero y no presenta grandes problemas para el ejercicio de su profesión si evita subir escaleras, llevar pesos o andar deprisa. Aquellas actividades propias de su profesión que requieran agacharse o flexionar el tronco son las peor toleradas. De hecho, siempre tiene dolores en los músculos paravertebrales.

RESULTADOS

En el test de la isquemia, aparecían contracturas musculares a los 37 segundos. Tras realizar 15 flexiones en cuclillas, la frecuencia cardiaca basal de 96 ppm aumentó a 140 ppm y la tensión arterial paso de 150/90 a 220/105 mm. Hg. Esta taquicardia se acompañó de un aumento de la frecuencia respiratoria.

Las CK en reposo eran de 303 UI/L, aunque se han alcanzado valores de 2741 UUI/L. Otros parámetros alterados eran: AST 75 UI/l, ALT 77 UI/l y ácido úrico de 8,5 mg/dL. El resto de determinaciones analíticas estudiadas estaban dentro de los valores de la normalidad.

La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,88	0,90	0,97	0,94	0,89	0,87
Piruvato	0,11	0,13	0,14	0,12	0,12	0,10
Amoniaco	41,7	178,5	199,6	82,6	50,2	40,8

Por la anamnesis, otro de los hermanos (V:3), que ahora tiene 48 años y reside en Noruega, presenta desde la edad de 15 años los mismos síntomas que el caso índice. Debido a su enfermedad fue eximido del servicio militar. No ha sido posible explorarlo, aunque sabemos que le han detectado cifras de CK séricas elevadas en sangre. Puede llevar a cabo su actividad laboral, aunque ésta no requiere realizar ejercicios, ya que es empresario de varios establecimientos de hostelería.

La madre (IV:2), fallecida a la edad de 64 años por infarto agudo de miocardio, se había quejado siempre de mialgias, agarrotamiento muscular, hinchazón de los músculos y mialgias relacionadas con el ejercicio con distribución preferente en las pantorrillas. Las hijas recuerdan que le tenían que llevar las bolsas de la compra y realizarle la mayoría de actividades domésticas. Recuerdan que en más de una ocasión las contracturas y dolores musculares la dejaban doblada y no podía erguirse, precisando que al menos dos personas la ayudaran a levantarse. No disponemos de más información.

El padre (IV:1), nacido en 1922, con antecedentes de cardiopatía isquémica, no presenta ninguno de los síntomas de la enfermedad. Tanto la exploración neurológica como el test de la isquemia no evidenciaron anomalías. Se realizaron determinación de niveles de CK que fueron normales.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM permitió identificar dos mutaciones en esta familia. Una mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una citosina es substituida por timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el trinucleótido **CGA** cambia a un codón stop (**TGA**).

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en dos, un fragmentos de 146 pb y otro de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado heterocigoto en los individuos V:2, V:5, V:9,V:9, V:11, V:13 y VI:1.

La segunda mutación detectada en esta familia, fue la **puntual missense (W797R)** en el exón 20, en la posición c2389 por la que una transición T→ C cambia un **TGG** (triptófano) por una **CGG** (arginina). Para detectar la mutación T→ C en el exón 20, diseñamos una PCR-RFLP. Un fragmento PCR fue amplificado a partir del ADN genómico, usando el *primer forward* 5'-TTGTACAAGGTGAGGGGTCCT-3' y luego un *primer reverse mismatched* 5'-TTGCCAGAGGTGGCGATGTTTCCTTATCACCATCCGCGTGC-3' (en negrita el nucleótido *mismatched*).

El fragmento 174 pb obtenido, fue sometido a digestión con la enzima de restricción *HhaI* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de agarosa al 2,5%. En

presencia de la mutación, la enzima corta el fragmento de 174 pb en dos, uno de 135 pb y otro de 39 pb, mientras que en el ADN normal el fragmento permanece sin cortar.

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP, en estado heterocigoto en los individuos IV:1, V:2, V:5, V:9, V:11, V:15 y VI:16.

FAMILIA PYGM-08

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de la provincia de Zaragoza. Los padres (I:1 y I:2), proceden de la misma población, Fabara, un pueblo que tiene censados 1230 habitantes. El padre había fallecido a la edad de 77 años como consecuencia de una trombosis arterial intestinal. La madre falleció a las 80 años de edad por un cáncer ginecológico. No pudimos demostrar consanguinidad mediante la entrevista, y solo pudimos averiguar datos de miembros del pedigrí hasta tres generaciones anteriores a la del caso probando.

Estudiamos en esta familia al caso índice (II:4), ya que sus hermanos, un varón de 65 años (II:1) y una mujer de 60 años (II:2), gozaban de buena salud y jamás se habían quejado de intolerancia al ejercicio, contracturas musculares o mialgias. Tampoco en los análisis de rutina les habían detectado alteraciones en los niveles de CK séricas. Rechazaron ser explorados.

El caso índice (caso II:4), nacido en Fabara (Zaragoza) en 1943, fue remitido para su estudio cuando tenía 52 años. Desde la edad de cuatro años, presentaba agarrotamiento en los músculos de las piernas y taquicardia mientras corría o subía por las montañas. Recuerda también que cuando tenía 12 años, tras montar 15 minutos en bicicleta subiendo una cuesta, quedó completamente exhausto con palpitaciones y taquipnea, precisando parar y descansar al menos media hora para poder reanudar nuevamente el camino. Durante las 24 horas siguientes a este ejercicio, emitió orinas oscuras.

De adulto, había tenido serios problemas al trabajar con los brazos en alto, como por ejemplo pintar el techo. Durante esta actividad presentaba contracturas en músculos

esternocleidomastoideos, escalenos, trapecios, deltoides, bíceps, tríceps y supinador largo, al menos durante los cuatro días siguientes. Presentaba una cierta mejoría, si al aparecer el primer síntoma de intolerancia descansaba unos minutos, aunque el tiempo preciso para la fase de adaptación del *second wind*, era variable de acuerdo con las características de cada ejercicio. Algunas veces precisaba 5-20 minutos. Otras, media hora, como ocurrió a la edad de 12 años. No recuerda haber tenido otros episodios de pigmenturia.

En los últimos años ha adaptado su estilo de vida a las limitaciones físicas de su enfermedad. Sabe que debe evitar correr aunque sean distancias inferiores a 25 metros, subir mas de 20 escalones, subir rampas, llevar objetos pesados y pintar techos, ya que aparecen calambres, contracturas, dolores musculares y en ocasiones presenta cuadros momentáneos de pérdida de visión, acompañado de sensación lipotímica.

La enfermedad no le ha impedido desarrollar su actividad laboral. Su historia profesional comprende un periodo laboral inicial de 25 años, en los que ejerció como electricista de automóviles. Posteriormente, estuvo trabajando 10 años como conductor. Finalmente, debido a las limitaciones funcionales de la enfermedad, obtuvo la Incapacidad Absoluta para el trabajo a la edad de 55 años. Desde entonces, se queja además de dolores musculares continuos generalizados, incluyendo los maseteros, que aparecen sin necesidad de ejercicio alguno, simulando un cuadro de fibromialgia o fatiga crónica.

En la exploración física había una mínima atrofia de los músculos supraespinoso y deltoides derechos. La fuerza muscular era normal, a excepción del deltoides derecho, donde era de 4/5. Los reflejos, sensibilidades y el resto de la exploración eran normales. La tensión arterial era 140/80 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 72 ppm. El peso era de 81 Kg. y la talla de 185 cm. En la exploración neurofisiológica, se observó una estricta normalidad de los parámetros electroneurográficos motores y sensitivos en la cuatro extremidades. El EMG mostraba signos discretos de cambios miopáticos difusos con actividad espontanea y PUM de características miógenas. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

RESULTADOS

En el test de la isquemia, podía aguantar el ritmo durante 51 segundos. En este momento la mano quedó contracturada, siéndole imposible abrir completamente los dedos de la mano.

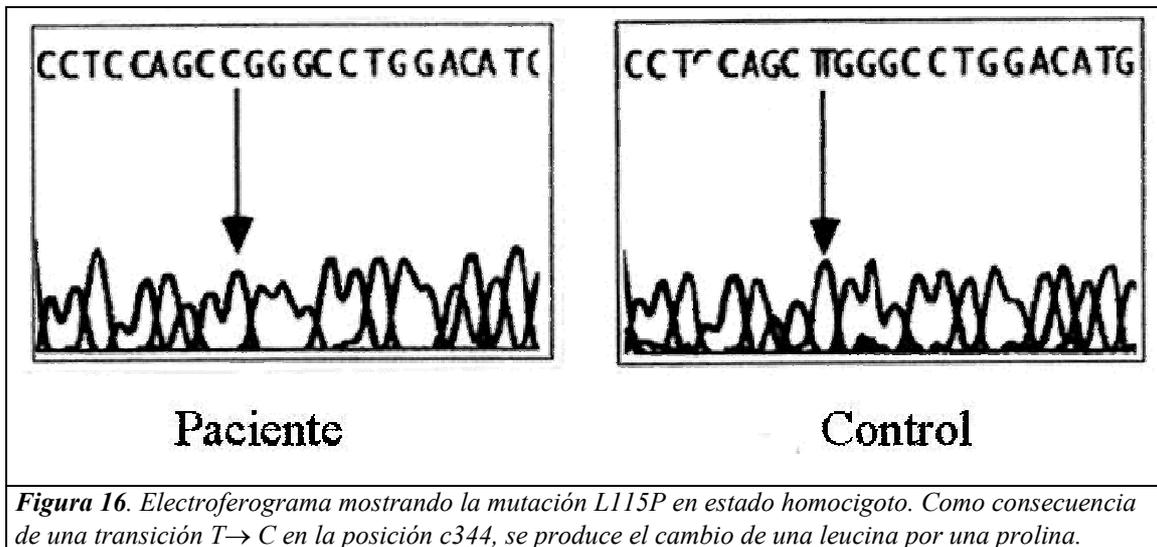
Los niveles de CK en suero eran en reposo de 485 UI/L, aunque en una ocasión presentó cifras de 6900 UI/L. La mioglobina en suero fue de 101. El ionograma, AST, ALT gammaGT, glucemia, creatinina, urea, proteínas, ácido úrico, bilirrubina estaban dentro de los valores normales.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoníaco normal. Los resultados de la curva fueron:

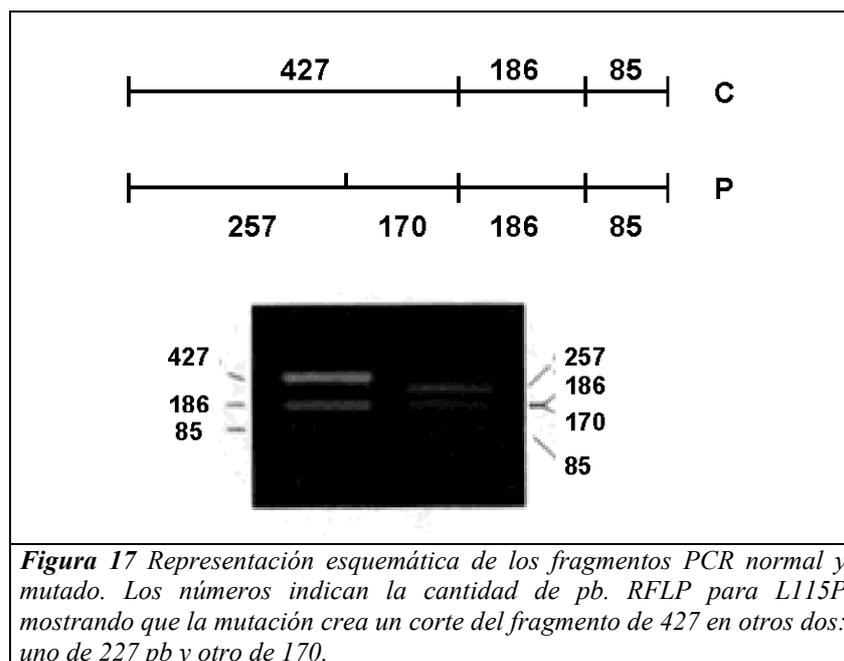
Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	1,18	1,12	1,09	1,18	1,19	1,19
Piruvato	0,13	0,12	0,14	0,13	0,12	0,12
Amoniaco	28,2	181,3	140,4	63,4	45,2	29,0

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo que mostró: la presencia de un aumento en la variabilidad del tamaño de las fibras y tendencia a la forma redondeada; presencia ocasional de núcleos centrales únicos; presencia de grandes vacuolas, generalmente subsarcolémicas de tamaño variable con tendencia a coalescer, que en ocasiones ocupaban casi la totalidad de la fibra. Las fibras vacuolizadas eran de todos los tipos. La tinción con miofosforilasa era negativa.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar una nueva mutación en esta familia: **la mutación puntual *missense* (L115P)** en el exón 3, en estado homocigoto, en la posición c344, en la que una timina es substituida por citosina (T→C). Como consecuencia de esta transición, la leucina codificada por el trinucleótido **CTG** cambia a una prolina (**CCG**). (*Figura 16*)



Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RCLP. El fragmento 698-bp obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción la *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En la secuencia completa el producto PCR de 698 bp es clavado por la *MspI* en tres fragmentos de 427 pb, 186 pb y 85 pb, mientras que en presencia de la mutación, el fragmento de 427 pb es cortado en dos fragmentos adicionales de 257 pb y 170 pb. (Figura 17)



RESULTADOS

El carácter patógeno de la mutación missense L115P está fundamentado en los siguientes hallazgos: 1) la leucina en la posición 115, está localizada en el dominio terminal de la enzima. Es una zona conocida como dominio regulador ya que contiene el sitio modificador covalente para la serina-14, el punto de unión para la mayor parte de efectores alóstericos. Estudios cristalográficos han demostrado que esta zona, la leucina-115, participa en el contacto de la intersubunidad necesario para la dimerización, lo cual es requerido para propagar la modulación alósterica del enzima. Además, la leucina contiene una cadena carbohidrato hidrofóbica, mientras que la prolina es un aminoácido que contiene un grupo amino secundario y aquellos puntos de unión de la cadena, tanto para los átomos de nitrógeno como para el α -carbono. Por lo tanto, el cambio de aminoácido puede alterar la estabilidad dimérica y afectar la actividad de la enzima.

La leucina en la posición 115, está altamente conservada en las glucógeno-fosforilasas de las diferentes especies (*Figura 18*). Esta mutación no pudo ser detectada entre 30 pacientes con enfermedad de McArdle, 40 pacientes afectados de otras miopatías metabólicas y 40 controles sanos.

<i>AA posición</i>	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
<i>Paciente</i>	A	C	D	E	A	T	Y	Q	P	G	L	D	M
<i>M-Humana</i>	A	C	D	E	A	T	Y	Q	L	G	L	D	M
<i>M-Bobina</i>	A	C	D	E	A	T	Y	Q	L	G	L	D	M
<i>M-Conejo</i>	A	C	D	E	A	T	Y	Q	L	G	L	D	M
<i>M-Ovina</i>	A	C	D	E	A	T	Y	Q	L	G	L	D	M
<i>M-Ratón</i>	A	C	D	E	A	T	Y	Q	L	G	L	D	M
<i>M-Rata</i>	A	C	D	E	A	T	Y	Q	L	G	L	D	M
<i>Drosófila</i>	E	E	A	M	Y	Q	L	G	L	D	I	E	N

Figura 18. Leucina 119: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 107 a 119). **M**= muscular. **L**= hepática. **B**= cerebral.

FAMILIA PYGM-09

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de una pequeña población de la provincia de Badajoz. Los padres (I:1 y I:2) proceden de la misma población, Usagre, un pequeño pueblo que tiene censados 2.044 habitantes.

Estudiamos 8 miembros en esta familia:

I:1, I:2; II:1, II:3, II:5, II:7, II:8 y III:1.

El caso índice (II:7), nacido en Barcelona en 1964, fue remitido para su estudio cuando tenía 23 años. Desde la edad de siete años, recuerda tener una considerable limitación en el ejercicio por mialgias. Esta intolerancia al ejercicio era especialmente evidente al correr, subir escaleras o realizar esfuerzos sostenidos. Refería fenómeno de "*second wind*" durante esas actividades. Después de actividades físicas extenuantes, había presentado varios episodios de pigmenturia. Durante uno de esos episodios, cuando tenía 23 años, tuvo que ser hospitalizado por presentar una insuficiencia renal aguda secundaria a un episodio de rabdomiólisis.

En la exploración física, la fuerza muscular, reflejos, sensibilidades y el resto de la exploración eran normales. La tensión arterial era 130/70 mm Hg. La frecuencia cardíaca en reposo era de 68 ppm. Su peso era de 74 Kg. y la talla de 166,0 cm. En la exploración neurofisiológica, el EMG mostraba un patrón miopático y las velocidades de conducción nerviosa eran normales. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En test de la isquémia, podía aguantar el ritmo durante 39 segundos. En este momento la mano quedó contraída, siéndole imposible abrir los dedos de la mano.

Los niveles de CK en suero eran de 9.740 UI/L, aunque en uno de los episodios de pigmenturia presentó cifras de 17.320 UI/L. La AST era de 1999 UI/L, la ALT de 178

RESULTADOS

UI/L y el ácido úrico de 8,1 mg/dL. En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,92	0,89	0,90	0,88	0,92	0,90
Piruvato	0,10	0,09	0,08	0,09	0,08	0,07
Amoniaco	12,8	38,4	42,6	34,4	24,4	15,9

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo cuádriceps de la pierna derecha, que mostró la presencia de una variabilidad en el tamaño de las fibras musculares. Se observaron vacuolas subsarcolémicas repletas de glucógeno. En la reacción histoquímica para la miofosforilasa no se observó tinción de las fibras musculares.

El paciente se ha visto forzado a adaptar su estilo de vida a las limitaciones causadas por la intolerancia al ejercicio. Puede trabajar como controlador de una cadena de montaje a través de ordenador sin especiales problemas. En los últimos cinco años, ha presentado varios episodios de dolor torácico, acompañado de taquicardia (200 latidos/min.) y aumento de la frecuencia cardíaca (40-60 respiraciones/min.) tras esfuerzos físicos intensos. Uno de esos episodios ocurrió después de un período de ejercicio de intensidad media. Se le realizaron un electrocardiograma y una prueba de esfuerzo (gammagrafía ergométrica con Talio) que descartaron isquemia coronaria.

La hermana mayor (caso II:1), de 46 años de edad, fue también estudiada ya que refería intolerancia al ejercicio y dolores musculares desde la infancia. Recuerda que cuando tenía aproximadamente 10 años, los síntomas aparecían al montar en bicicleta, correr o al realizar la gimnasia en la escuela. No refería episodios de pigmenturia. Se habían detectado cifras elevadas de CK, alcanzado valores de (2.188 UI/L).

En la exploración física, la fuerza muscular era normal. Su peso era de 60,5 kg., la talla de 159,0 cm., la tensión arterial de 130/70 mm Hg y el pulso de 66 ppm. No se

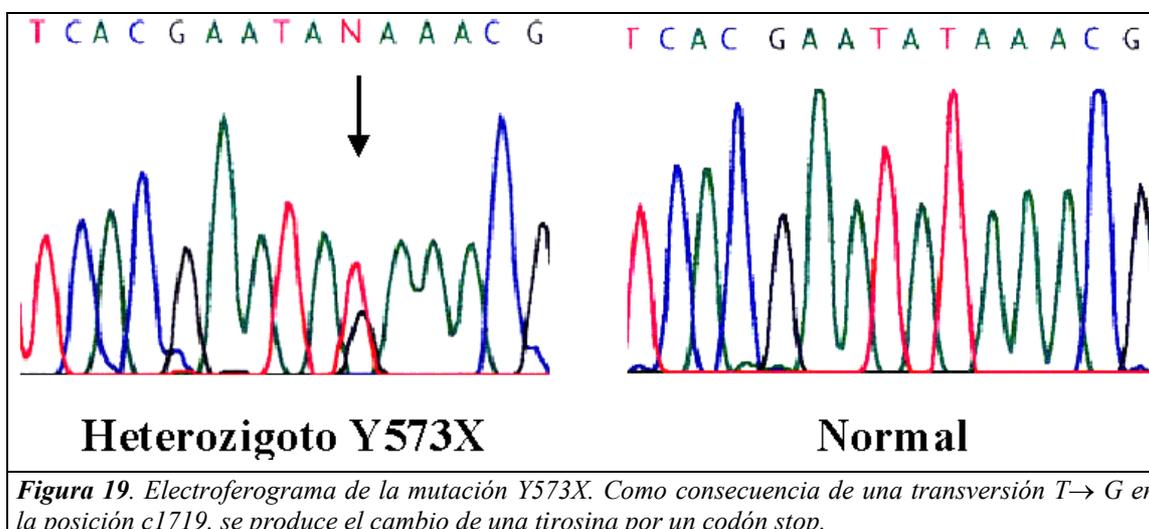
observaron otras alteraciones en la exploración neurológica. En el test de la isquemia, aparecían contracturas musculares a los 42 segundos. Las CK en reposo eran de 298 UI/L, la AST de 42 UI/L y la ALT de 40 UI/L. La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,96	0,94	1,02	0,98	0,94	0,98
Piruvato	0,10	0,11	0,09	0,09	0,09	0,08
Amoniaco	15,2	42,4	48,2	40,4	26,2	14,4

Puede realizar las actividades diarias propias de una ama de casa, exceptuado aquellas que requieran llevar peso, tender la ropa o hacer fuerza sostenida con los brazos. Su hija (III:1) de 12 años, se queja también de mialgias después de ejercicios físicos. No refiere contracturas ni pigmenturia. Sus CK séricas fueron normales tanto en reposo como después del ejercicio.

Al estudiar el resto de miembros de la familia, detectamos que el padre (I:1), que ahora tiene 74 años de edad y goza de perfecto estado de salud, presentaba repetidamente cifras de CK discretamente elevadas (376 UI/L). No refería ninguno de los síntomas de la enfermedad de McArdle. Tanto el electrocardiograma como el test del ejercicio isquémico en el antebrazo fueron normales. El resto de miembros de la familia (I:2, II:3, II:5 y II:8) están sanos, y tanto la exploración neurológica como los valores de CK fueron normales.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar dos mutaciones en esta familia. **Una mutación puntual nonsense (Y573X)** en el exón 14, en la posición c1719, en la que una timina es substituida por guanina (T→G). Como consecuencia de esta transversión, la tirosina codificada por el codón **TAT** cambia a un codón stop (**TAG**). (Figura 19).



Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 268-bp obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción *BfaI* (New England Biolab, Beverly, MA) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. La enzima corta la secuencia CTAG. Empleamos un proceso *mismatch* para cambiar nuestra secuencia ATAG a CTAG, la secuencia que corta la *BfaI*. El nuevo *primer* para realizar esta *mismatch* fue: 14MISF: 5'-CGACATCCAGGTGAAGCGGATTCACGACTA-3'. El *primer* 14R utilizado fue: 5'-AAGTCCAAAGGAGATGTTGG-3'.

En presencia de la mutación, la enzima corta el fragmento de PCR 268 pb en dos fragmentos, uno de 150 pb y otro de 118 pb. Como la mutación es heterocigota, en el gel de poliacrilamida veremos tres bandas: una de 150 pb, otra de 118 pb y otra de 268 pb.

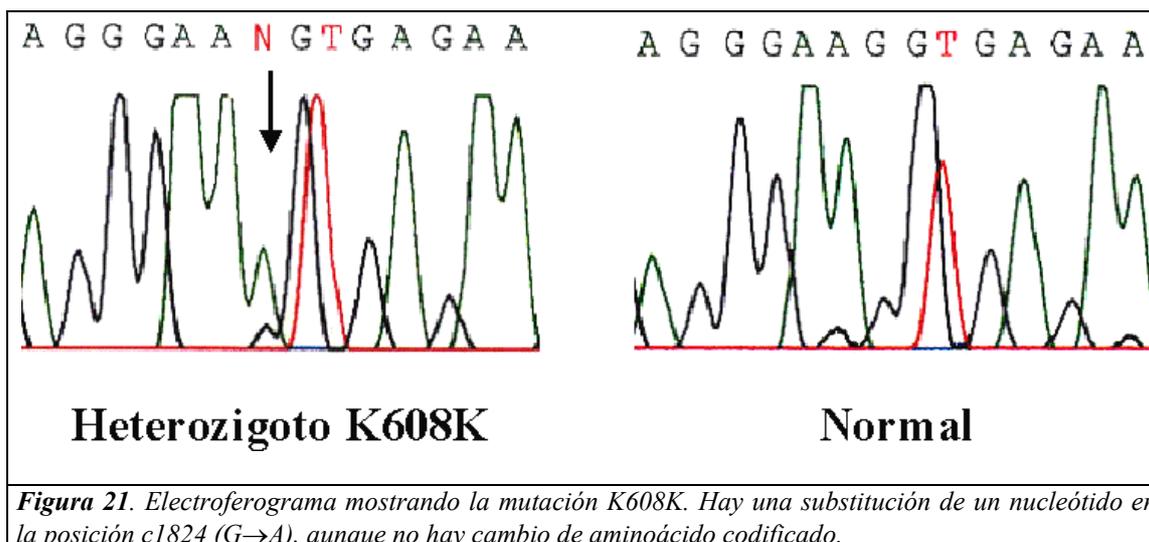
El análisis RLFP confirmó que el caso probando, la hermana afecta, la madre y la sobrina, eran portadores heterocigotos de esta mutación, mientras que el padre y el resto de hermanas no eran portadores de la mutación.

<i>AA posición</i>	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
<i>Paciente</i>	K	R	I	H	E	X	K	R	Q	L	L	N	C
<i>M-Humana</i>	K	R	I	H	E	Y	K	R	Q	L	L	N	C
<i>M-Bovina</i>	K	R	I	H	E	Y	K	R	Q	L	L	N	C
<i>M-Conejo</i>	K	R	I	H	E	Y	K	R	Q	L	L	N	C
<i>M-Ovina</i>	K	R	I	H	E	Y	K	R	Q	L	L	N	C
<i>M-Ratón</i>	K	R	I	H	E	Y	K	R	Q	L	L	N	C
<i>M-Rata</i>	K	R	I	H	E	Y	K	R	Q	L	L	N	C
<i>Drosófila</i>	K	R	I	H	E	Y	K	R	Q	L	L	N	C

Figura 20. Tirosina 573: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 568 a 580). **M**= muscular. **L**= hepática. **B**= cerebral.

El carácter patógeno de la mutación nonsense Y573X está fundamentado en los siguientes hallazgos: 1) el codón stop produce una finalización prematura de la traducción del ARNm, resultando en una proteína truncada de 573 aminoácidos, en lugar de los 842 normales. 2) La tirosina es un aminoácido aromático que en la posición 573 está altamente conservado en muchas especies (*Figura 20*). 3) No detectamos estas mutaciones en otros 30 pacientes con enfermedad de McArdle, en 30 pacientes afectados de miopatías metabólicas y 60 controles normales.

La **segunda mutación (K608K)** identificada en esta familia, fue una mutación del tipo *splice-junction* en el codón 608 al final del exón 15 e inicio del intrón 15. Hay una substitución del nucleótido en la posición c1824 (G→A), aunque no hay cambio de aminoácido codificado[lisina (AAG) a otra lisina (AAA)](*Figura 21*).



Esta mutación fue detectada en estado heterocigoto en el caso probando, en la hermana afectada y en el padre, mientras que la madre, el resto de hermanas y su sobrina no eran portadores de la mutación.

Debido al importante papel de esta mutación en el *splicing*, estudiamos el cADN a partir del RNA extraído del músculo, demostrándose que esta mutación produce un *splicing* anómalo del exón adyacente. Esta mutación afecta al consenso clásico del concepto de límites intrón/exón que sirve como señal de unión, produciendo un salto del exón vecino, tal como se demostró en el análisis de cDNA. Estas mutaciones incorrectamente asumidas como polimorfismos neutrales, traduciblemente silentes y que producen un salto de exón, son particularmente importantes ya que deben actuar a nivel del RNA. La mutación G→A destruye los nucleótidos consenso **gt** altamente conservados, en el final del extremo 5' del intrón 15. Esto ocurre como resultado de un cambio de AACc/gtgagtg a AAC/atgagtg. La secuencia CCAG/GTGAAG en el exón 15, es así erróneamente reconocida y saltada, conduciendo a una delección de todas las bases del exón 16 en la transcripción.

La delección en el cDNA sugirió que la *splice-site* esté probablemente afectada en la mutación. El análisis de la secuencia del intrón 15, identificó que la mutación era substitución de una adenina por una guanina en el 3' splice-site del intrón 15.

FAMILIA PYGM-10

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. El padre (II:6) del caso probando nació en Barcelona, aunque su línea paterna (I:1) es originaria de Béjar (municipio con 15.123 habitantes en la provincia de Salamanca) y la línea materna (I:2) de Los Pobiles (población de Teruel, perteneciente al municipio de Olba con 210 habitantes).

La madre (II:7) del caso probando, es natural de Barcelona, al igual que su padre (I:3), aunque su madre (I:4) era de Camporrobles (1.361 habitantes-Valencia). Mediante la entrevista no pudimos demostrar consanguinidad con los datos obtenidos del árbol genealógico familiar, que comprendía cuatro generaciones.

En esta familia estudiamos a 3 miembros:

(II:6, II:7 y III:5)

El caso probando (III: 5), nacida en Esplugas del Llobregat (45.127 habitantes) en 1979, refiere desde la edad de 3 años intolerancia al ejercicio, mialgias y contracturas musculares, desencadenadas por actividades como correr, hacer gimnasia, subir escaleras y llevar objetos pesados. No recuerda episodios de mioglobinuria.

A la edad de 16 años, tuvo que ser asistida en Urgencias por presentar contracturas musculares y dolor en el antebrazo izquierdo después de realizar un sobreesfuerzo levantando un peso. Su *second wind* medio es de 4 minutos. Durante las actividades intensas, aparecían crisis de taquicardias (hasta 160 ppm).

Desde entonces, ha adaptado su ritmo de vida a las limitaciones que la enfermedad le condiciona. Trabaja como administrativa en una oficina de Turismo.

La exploración neurológica era normal. Su tensión arterial era 115/60 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 62 ppm. Su peso era de 45 Kg. y la talla de 155,0 cm.

RESULTADOS

En la exploración neurofisiológica, la neurografía motora y sensitiva eran normales. En el estudio EMG, se observó la presencia de un discreto patrón miopático en bíceps y tibial anterior. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 40 segundos, después la mano quedaba agarrotada.

Los niveles de CK en suero eran de 1610 UI/L. Otros parámetros elevados fueron la AST 46 UI/L, la ALT 47 UI/L y el ácido úrico de 6,1 mg/dL. Tanto el hemograma como resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales. La función tiroidea era igualmente normal.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	1,00	0,60	1,02	1,06	1,04	1,02
Piruvato	0,02	0,06	0,05	0,05	0,03	0,05
Amoniaco	29,0	390	238	142	93	32

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de variabilidad en el tamaño de las fibras con presencia de vacuolas subsarcolémicas, conteniendo material granular fino PAS positivas. La tinción con miofosforilasa era negativa.

El padre (II:6) no refería molestias musculares, y tanto la exploración neurológica como los niveles de CK eran normales. En cambio, la madre (II:7) de 54 años, siempre se ha quejado de cansancio al subir escaleras y cuestas, levantar pesos con la mano, sostener el secador o limpiar los cristales de casa. Parece ser, que la abuela materna (I:4) tenía las mismas molestias.

El hermano del caso índice (III:4) que ahora tiene 25 años, también se queja de cansancio durante actividades físicas no intensas. Pesa 56,0 kg y mide 176,0, aunque no disponemos de más información.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió la presencia de la mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una citosina es substituida por una timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el codón CGA cambia a un codón stop (TGA).

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido, fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales, la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en dos fragmentos de 146 pb y de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado homocigoto en el caso probando (III:5) y en estado heterocigoto en sus padres (II:4 y II:5).

FAMILIA PYGM-11

Historia de la familia: características y hallazgos clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia materna es originaria de Vic, un municipio de la provincia de Barcelona, con un censo actual de 32.703 habitantes. El padre (II:3) nació en Mirandilla, un municipio de 1.339 habitantes en la provincia de Badajoz.

Estudiamos 2 miembros en esta familia:

I:2 y II:8

RESULTADOS

El caso índice (II:8), nacido en Vic en 1979, presentaba desde la edad de 8 años, cansancio, mialgias y contracturas durante el ejercicio. Actividades como correr, subir cuestras, hacer abdominales o llevar pesos en brazos, le provocaban la aparición de los síntomas. No podía seguir el ritmo de sus compañeros de clase en los juegos y deportes. Cuando hacía el 3^{er} curso de bachillerato (BUP), a la edad de 17 años, presentó contracturas musculares generalizadas después de una clase de gimnasia intensa. Tuvo que ser asistido en un centro médico. Por la noche presentó orinas oscuras. Desde entonces evita ejercicios intensos y las actividades que le provocan los síntomas. Refiere un *second wind* de 1-3 minutos, aunque cada vez nota menor resistencia.

Ha adaptado su ritmo de vida a las limitaciones que la enfermedad le condiciona, evitando especialmente subir cuestras o escaleras, correr, o llevar pesos en los brazos, aunque puede trabajar como mozo en un almacén de frutas. Solo ha presentado dos episodios de mioglobinuria

En la exploración física, la fuerza muscular, reflejos, sensibilidades y el resto de la exploración eran normales. La tensión arterial era 140/65 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 68 ppm. Su peso era de 65 Kg. y la talla de 164 cm. En la exploración neurofisiológica, la neurografía motora y sensitiva, así como las repuestas F, no mostraron anomalías significativas. La estimulación repetitiva basal y post-esfuerzo no detectaron alteraciones de la transmisión neuromuscular. En el EMG, la actividad voluntaria en el máximo esfuerzo y el *turns amplitude* eran normales en los músculos explorados. Sólo en el cuádriceps se detectaron signos miopáticos mínimos. Se pudo conseguir una contractura en el bíceps derecho sin registrar ninguna actividad eléctrica en el EMG.

En test de la isquemia, podía aguantar el ritmo durante 46 segundos. En este momento la mano quedó contracturada, siéndole imposible abrir los dedos de la mano.

Los niveles de CK en suero eran de 1.095 UI/L, aunque en uno de los episodios de pigmenturia presentó cifras de 40.508 UI/L. Otros parámetros alterados fueron: AST de 61 UI/L y ALT de 52 UI/L. El resto de determinaciones fue normal. En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,76	0,67	0,73	0,78	0,81	0,72
Piruvato	0,06	0,04	0,09	0,07	0,10	0,07
Amoniaco	46,7	100,2	62,3	49,6	47,8	35,4

Se realizó una biopsia muscular, mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto, en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de fibras de tamaño relativamente irregular con tendencia a la forma redondeada. Aproximadamente el 20% de las fibras tenían vacuolas subsarcolémicas, en forma de semiluna, que en ocasiones incluían al núcleo. Las vacuolas eran PAS positivas, aunque algunas estaban vacías. Con los enzimas oxidativos, se observó cierta irregularidad en el patrón intermiofibrilar con áreas centrales de menor actividad oxidativa. En la reacción histoquímica para la miofosforilasa no se observó tinción de las fibras musculares.

La madre (I:2), de 67 años, es diabética desde hace 16 años y sufrió un IAM (infarto agudo de miocardio) en Agosto-01. Nunca se ha quejado de síntomas musculares ni recuerda episodios de mioglobinuria. Los niveles en reposo de CK eran normales, y no se produjeron contracturas en el test de la isquemia, aunque sorprendentemente, el lactato y el piruvato se incrementaron poco durante el test. Los valores que obtuvimos son:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,92	1,17	1,39	0,92	1,16	0,92
Piruvato	0,10	0,11	0,09	0,09	0,08	0,07
Amoniaco	12,5	34,4	24,4	13,0	15,9	6,2

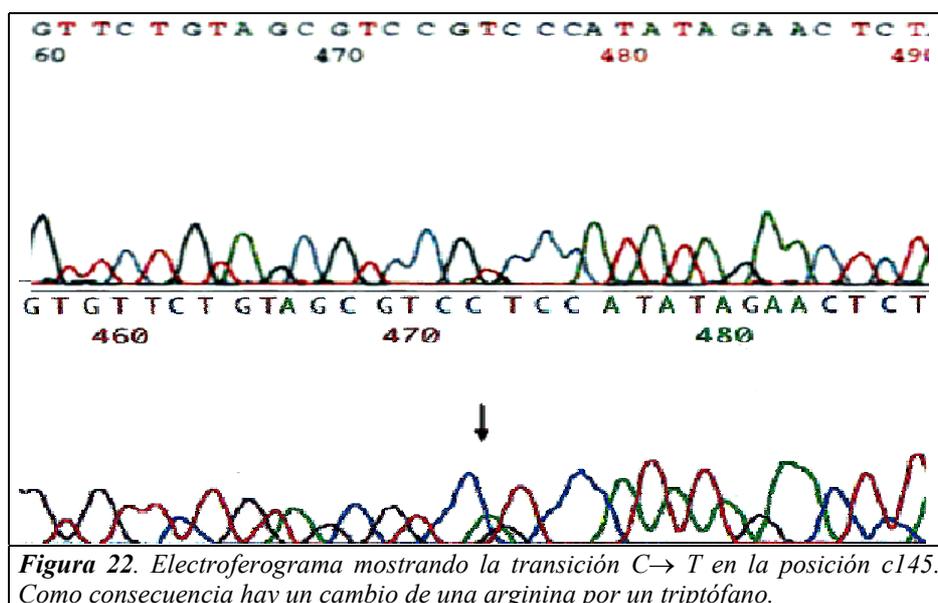
RESULTADOS

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió la presencia de la mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una citosina es substituida por una timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el codón CGA cambia a un codón stop (TGA)

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales, la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un clavado de este fragmento en dos fragmentos de 146 pb y de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado heterocigoto en el caso probando (II:8) y en su madre (I:2).

Recientemente, hemos detectado una segunda mutación puntual **missense (R93W)** en el exón 2, en la posición c277, en la que una arginina es substituida por triptófano (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el codón CGG cambia a un triptófano codificada por el codón (UGG). (*Figuras 22 y 23*)



<i>AA posición</i>	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
<i>Paciente</i>	L	E	F	Y	M	G	W	T	L	Q	N	T	M
<i>M-Humana</i>	L	E	F	Y	M	G	R	T	L	Q	N	T	M
<i>M-Bovina</i>	L	E	F	Y	I	G	R	T	L	Q	N	T	M
<i>M-Conejo</i>	L	E	F	Y	M	G	R	T	L	Q	N	T	M
<i>M-Ovina</i>	L	E	F	Y	I	G	R	T	L	Q	N	T	M
<i>M-Ratón</i>	L	E	F	Y	M	G	R	T	L	Q	N	T	M
<i>M-Rata</i>	L	E	F	Y	M	G	R	T	L	Q	N	T	M
<i>B-Humana</i>	L	E	F	Y	M	G	R	T	L	Q	N	T	M
<i>Drosófila</i>	L	E	Y	Y	M	G	R	S	L	T	N	T	M

Figura 23. Arginina 93: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 87 a 99). **M**= muscular. **L**= hepática. **B**= cerebral.

FAMILIA PYGM-12

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de una pequeña población de la provincia de Segovia. Tanto la madre, fallecida a los 69 años, como el padre (I:1 y I:2), son originarios de la misma población, Bercimuel, un pequeño pueblo de Segovia, que tiene en la actualidad 84 habitantes censados. No pudimos demostrar mediante la entrevista, una posible consanguinidad.

Estudiamos a 3 miembros de esta familia:

II:1, II:6 y II:9.

El caso índice (II:1), nacido en Bercimuel (Segovia) en 1951, fue remitido para su estudio cuando tenía 37 años. Ya a la edad de 11 años, tenía contracturas musculares y

RESULTADOS

dolores inducidos por el ejercicio. Le era muy difícil seguir el ritmo de sus compañeros de edad en juegos y deportes. A la edad de 14 años, presentó el primero de los 30 episodios de pigmenturia, tras una carrera de unos 1.000 m. Subir escaleras, correr, llevar objetos pesados o atornillar, le precipitaban mialgias y calambres que le obligaban a descansar. El tiempo que tenía que descansar dependía de la severidad de los síntomas. Cuando aparecían los primeros síntomas, si paraba durante unos 5 minutos, podía reanudar la actividad. Durante las actividades intensas, aparecían crisis de taquicardias (hasta 240 ppm) y aumento de la frecuencia respiratoria. En los últimos cuatro años, notó pérdida de fuerza muscular en brazos y piernas. Desde entonces, adaptó su ritmo de vida a las limitaciones que la enfermedad le condicionaba.

En la exploración física, tenía una debilidad simétrica en el bíceps braquial, deltoides y psoas (4+/5). En los músculos restantes, el balance muscular era normal, así como el resto de la exploración neurológica. La tensión arterial era 135/85 mm Hg. La frecuencia cardíaca en reposo era de 86 ppm. Su peso era de 60 Kg. y la talla de 174 cm. En la exploración neurofisiológica, los parámetros neurográficos eran estrictamente normales. En el EMG, durante el reposo, se detectaban potenciales espontáneos más frecuente en deltoides y bíceps. El patrón voluntario al esfuerzo máximo era interferencial completo con una amplitud global del trazado también normal, pero con una gran proporción de potenciales polifásicos que a menudo correspondían a unidades motoras de breve duración y baja amplitud. El estudio automático (*turns amplitude*) del bíceps y vasto interno no mostró desviaciones definitivamente patológicas. Sin embargo la mayoría de registros estaban cerca del lado miopático. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 30 segundos. En ese momento la mano quedó contracturada.

Los niveles de CK en suero eran de 866 UI/L. Otras anomalías enzimáticas presentes en sangre fueron: AST de 46 UI/L, ALT de 40 UI/L y LDH 379 UI/L. Tanto el hemograma como la glucosa, ácido úrico, creatinina, bilirrubina, ionograma y proteínas, estaban dentro de los valores de la normalidad.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,94	0,95	1,02	1,01	1,08	0,98
Piruvato	0,10	0,09	0,08	0,09	0,08	0,07
Amoniaco	28,8	54,4	58,4	34,4	30,2	28,9

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo deltoides del brazo izquierdo, que mostró: a) la presencia de una desigualdad en el tamaño de las fibras con algunas muy atroficas sin formar agrupamientos, b) presencia de núcleos centrales aislados y de pequeñas vacuolas, múltiples y de preferente localización subsarcolémica, y c) discreta fibrosis endomisial. Las lesiones observadas afectaban a ambos tipos de fibras. En algunas fibras se observó un discreto aumento de la actividad oxidativa intermiofibrilar y subsarcolémica.

Las vacuolas subsarcolémicas y algunas áreas de las fibras, presentaban PAS positividad que desaparecían tras la digestión con amilasa. La tinción con miofosforilasa fue negativa.

Desde entonces, el paciente se ha visto forzado a adaptar su estilo de vida a las limitaciones causadas por la intolerancia al ejercicio. Las contracturas le causan serios problemas en su vida íntima, ya que aparecen incluso durante las relaciones sexuales. Hasta la edad de 50 años estuvo trabajando como carpintero metálico, y debido a las severas limitaciones que le ocasionaba (incluso atornillar dos vueltas completas), tuvo que solicitar la invalidez absoluta.

El segundo de sus hermanos (II:6), de 47 años de edad, fue estudiado como consecuencia de la entrevista con el caso probando, interrogando sobre otros posibles miembros de la familia sospechosos de estar afectados. Accedió voluntariamente a la

RESULTADOS

entrevista, exploración física, curva de lactato y determinaciones bioquímicas/moleculares. Aunque no había acudido a su médico de cabecera para valorar las molestias musculares, recuerda que ya a la edad de 17 años tenía dolores musculares durante las actividades deportivas. Completó el servicio militar, a pesar de que durante las marchas presentaba mialgias, contracturas, palpitations y sensación de asfixia. Una ocasión en la que tuvo que ayudar a empujar el coche de un amigo para ponerlo en marcha, las molestias le duraron 2 días. Después de estas actividades intensas orinaba oscuro. Recuerda un total de 6 episodios de mioglobinuria. Explica que después de 300 metros de andar rápido tiene que pararse, y tras descansar 10 minutos, puede reanudar otra distancia similar.

En la actualidad trabaja como reparador de neumáticos. Le es imposible llevar pesos y se le quedan agarrotados los músculos de las piernas cuando trabaja en posición agachado. También refiere que los síntomas pueden provocarse durante las relaciones sexuales.

La exploración neurológica mostró una debilidad simétrica en los psoas (+4/5), siendo el resto de la exploración neurológica normal. El peso era de 69.0 kg. y la talla de 161,0 cm. La frecuencia cardíaca era de 68 ppm y la ta de 140/75 mm HG. En el test de la isquemia, aparecían contracturas musculares a los 32 segundos. Las CK en reposo eran de 5.024 UI/L. La AST era de 97 UI/L y la ALT de 69 UI/L. El ácido úrico, glucosa, creatinina e ionograma eran normales. La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,70	1,04	0,70	0,93	0,70	0,70
Piruvato	0,13	0,14	0,16	0,15	0,14	0,12
Amoniaco	55,7	255,6	144,1	78,3	61,3	51,2

Otro de los hermanos (II: 9) del probando, un varón que actualmente tiene 45 años y que tampoco había acudido nunca al médico por sus molestias musculares, explicaba que desde la edad de 10 años tenía intolerancia al ejercicio, mialgias y contracturas en

las piernas que aparecían al correr, subir 30 peldaños de escaleras y llevar pesos en los hombros. Recuerda unos 20 episodios de mioglobinuria a lo largo de su vida, siempre relacionados por esfuerzos intensos o actividades extenuantes.

Durante el servicio militar tuvo serios problemas, especialmente en las marchas, donde tuvo crisis de taquicardia y un periodo de pérdida de conciencia.

Explica que después de 300 metros de andar rápido, tiene que pararse y luego, tras descansar menos de 5 minutos, puede reanudar otra distancia similar.

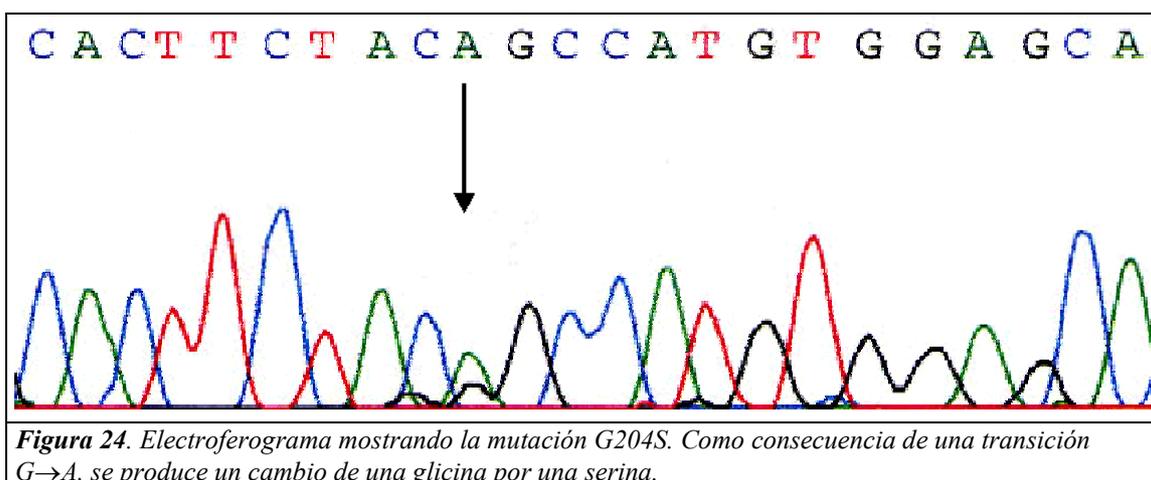
Desempeña su profesión, carpintero metálico, con notorias dificultades. Le es imposible sostener las ventanas metálicas, apretar tornillos, llevar pesos o subir mas de 20 escalones. Al igual que sus hermanos, la enfermedad le causa serias dificultades en la actividad sexual.

La exploración neurológica no mostró alteraciones significativas. El peso era de 93,0 kg. y la talla de 180,0 cm. La frecuencia cardiaca era de 60 ppm y la tensión arterial de 130/70 mm Hg. En el test de la isquémia, aparecían contracturas musculares a los 50 segundos. Las CK en reposo eran de 1.294 UI/L. Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas fueron normales. La curva de lactato y piruvato fue plana. Los valores fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,46	0,20	0,20	0,46	0,70	0,70
Piruvato	0,10	0,08	0,09	0,98	0,11	0,11
Amoniaco	30,8	197,2	162,5	89,2	49,6	37,7

RESULTADOS

Se identificó una **mutación puntual missense (G204S)** en el exón 5, en estado homocigoto, en la posición c610, en la que una guanina es substituida por adenina (G→A). Como consecuencia de esta transición, la glicina codificada por el codón **GGC** cambia a una serina (**AGC**). (Figuras 24 y 25)



Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RCLP. El producto-PCR de 87-bp obtenido fue digerido con la enzima de restricción endonucleasa la *CfrI* (Fermentas, USA) y analizado en un gel de agarosa al 2,5%. En presencia de la mutación, el producto PCR de 87 bp permanece sin cortar, mientras que en su ausencia, el ADN normal (*wild type*) es clavado en dos fragmentos más pequeños de 29 pb y 58 pb. Para confirmar la presencia de esta mutación y excluir la posibilidad de mutaciones en los codones 203 o 205, los cuales podrían abolir el sitio de *CfrI*, secuenciamos el producto PCR directamente con el kit de secuenciación *ABIDyeDeoxy Terminator Cycle*.

Esta mutación fue detectada en estado homocigoto en los tres hermanos estudiados (II:1, II:6 y II:9).

<i>AA posición</i>	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
<i>Paciente</i>	P	V	H	F	Y	S	H	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Humana</i>	P	V	H	F	Y	G	H	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Bovina</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Conejo</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Ovina</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Ratón</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Rata</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>B-Humana</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	P	D

Figura 25. Glicina 204: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 199 a 211). **M**= muscular. **L**= hepática. **B**= cerebral.

FAMILIA PYGM-13

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de una población de León. La madre (III:2), fallecida a la edad de 69 años a consecuencia de un proceso neoplásico de colon y el padre (III:1) fallecido a los 76 años a consecuencia de un AVC (accidente cerebrovascular), eran originarios de La Virgen del Camino (provincia de León), una pequeña población que junto a otros siete núcleos, constituyen el municipio de Valverde de la Virgen, con un censo de 4.208 habitantes. Los padres eran primos hermanos entre sí, de tal manera que la abuela materna y la abuela paterna eran hermanas.

El caso probando (IV: 6), nacida en Virgen del Camino en 1935, fue remitida desde el Servicio de Reumatología de otro Hospital cuando tenía 64 años por cifras elevadas de CK, detectadas en Agosto-99 a raíz del control de su dislipemia. Había recibido tratamiento con pravastatina durante los dos últimos años, aunque su hipercolesterolemia era ya conocida desde la edad de 45 años y tratada con otros normolipemientes, incluidos otros inhibidores de la HMG-CoA reductasa como lovastatina, simvastatina, fenofibrato, o fibratos tipo bezafibrato, clofibrato o

RESULTADOS

gemfibrozilo. Durante el ingreso se detectaron cifras de CK de 5.155, AST de 67 UI/L, LDH de 1.327 UI/L, ANA 1/320 patrón moteado de (valores normales < 1:64) y presencia de calcificaciones renales en la ecografía abdominal. Inicialmente se consideró la posibilidad de una miopatía inducida por estatinas. Se recomendó su sustitución y derivación a nuestro Centro para proseguir su estudio.

En la entrevista dirigida, refería cansancio en brazos con el esfuerzo mantenido desde hacía unos cuatro años, aunque desde la edad de 44 años tenía dolores musculares y contracturas durante el ejercicio que le obligaban a parar. Por ejemplo, limpiar los baldosines de la cocina, llevar objetos pesados, limpiar los cristales, limpiar la ropa a mano o secarse el cabello con un secador de mano, le ocasionaba mialgias y contracturas en músculos del antebrazo y manos. Al correr, subir más de 40 escalones o andar durante más de media hora, aparecían dolores en pantorrillas o ingles. Si se esforzaba más de lo permitido, tenía además, palpitaciones y disnea. No recordaba episodios de mioglobinuria. Si descansaba 4 ó 5 minutos cuando aparecían las primeras molestias, podía reanudar el ejercicio, estrategia que empleaba para salir de paseo.

Desde entonces, nota que si no se esfuerza, evitando aquellas actividades descritas, puede hacer una vida más o menos normal. Explica que no debe superar los 15 minutos de paseo ni subir las escaleras de un 2º piso. Con este ritmo de vida las cifras de CK basales se mantienen por debajo de 300 UI/L.

La exploración neurológica fue normal. La tensión arterial era 140/80 mm Hg. y la frecuencia cardiaca en reposo de 76 ppm. El peso era de 65,0 Kg. y la talla de 150,0 cm. En la exploración neurofisiológica, había una estricta indemnidad en los parámetros neurográficos motores y sensitivos, sin signos de polineuropatía periférica ni atrapamientos nerviosos. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular. El EMG mostró signos miogénos muy leves en el músculo bíceps braquial, de muy leve expresividad electrofisiológica.

Los niveles de CK en suero eran de 699 UI/L. También se detectó AST de 67 UI/L. Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test de la isquemia, solo pudo aguantar el ritmo durante 47 segundos. En ese momento la mano quedó contracturada y dolorosa. No se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	1,3	1,3	1,1	1,3	1,3	1,4
Piruvato	0,05	0,09	0,06	0,06	0,05	0,06
Amoniaco	43	296	199	154	46	94

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto, en el músculo bíceps braquial del brazo derecho, que mostró variabilidad en el tamaño de las fibras y presencia de vacuolas subsarcolémicas, conteniendo material granular fino PAS positivo. Alguna de las vacuolas estaba vacía. La tinción con miofosforilasa fue negativa.

El segundo de sus hermanos (IV:3), fallecido a los 67 años, y una hermana (IV:5) fallecida a los 42 años de IAM, se quejaban de mialgias, intolerancia al ejercicio y fatiga fácil desde la juventud, aunque no disponemos de mas información. El resto de los hermanos (IV:1 y IV:8) y la única hija del caso probando (V:6) son asintomáticos.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió la presencia de la mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145 en la que una citosina es substituida por timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el codón CGA cambia a un codón stop (TGA).

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales, la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el

fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en otros dos fragmentos, uno de 146 pb y otro de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado homocigoto en la paciente (IV:6).

FAMILIA PYGM-14

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La rama paterna de la familia (II:5, I:1 y I:2) es originaria de Madrid. La madre (II:6), es de Salamanca, ciudad con 156.368 habitantes. Mediante la entrevista, no fue posible demostrar una posible consanguinidad.

Estudiamos a 4 miembros de esta familia:

III:4, III:5, III:6 y II:6.

El caso índice (caso III:5), nacido en Salamanca en 1980, fue remitido cuando tenía 21 años para realizar diagnóstico molecular. Refería desde la infancia, cuando tenía 3 años, debilidad muscular, mialgias y sensación de entumecimiento de los músculos de las extremidades tras la realización de ejercicios físicos. Ya en la guardería, tenía serios problemas en los juegos, sobre todo aquellos en los que era preciso correr. Recuerda que cuando jugaban a dar vueltas en el patio, quedaba rezagado en el último lugar y optaba por esperar a que le doblaran para que pareciera que iba en cabeza.

Cada vez que realizaba un esfuerzo físico presentaba mialgias, contracturas, hinchazón muscular, fiebre y pigmenturia. Llevar la mochila a cuestras, subir las escalones de dos pisos, esquiar, tomar apuntes, masticar y lavarse el cabello, son otras de las actividades que le provocan las molestias. Actualmente solo tolera pasear durante media hora.

El tiempo que tiene que descansar (*second wind*) para poder reanudar el ejercicio tras la aparición de los primeros síntomas es variable dependiendo del tipo de actividad, pero por término medio es de 3 minutos.

Durante las actividades intensas, aparecían crisis de taquicardias (hasta 200 ppm). Recuerda 80 episodios de pigmenturia.

En los últimos dieciocho meses anteriores a nuestro estudio, había notado un empeoramiento de la enfermedad, especialmente en la resistencia al ejercicio y en la duración/intensidad de las molestias.

En la exploración física, la fuerza muscular era normal, no habían atrofas musculares y el resto de exploración era absolutamente normal. La tensión arterial era 120/80 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 72 ppm. Su peso era de 60,0 Kg. y la talla de 176,0 cm. El EMG detectó hallazgos compatibles con un proceso miopático en los músculos explorados. Los parámetros neurográficos eran estrictamente normales. Tampoco se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular.

En el test de la isquemia, solo podía aguantar el ritmo durante 38 segundos. En ese momento la mano quedó acalambrada, siéndole imposible abrir los dedos de la mano.

Los niveles basales de CK en suero eran de 1.841 UI/L, aunque en una ocasión alcanzaron valores de 120.690 UI. Otras enzimas alteradas fueron: AST 41 UI/L, ALT 50 UI/L. El ácido úrico era de 6,1 mg/dL. El hemograma y el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del ejercicio isquémico, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	1,09	1,11	1,10	1,09	1,08	1,08
Piruvato	0,12	0,11	0,13	0,12	0,10	0,09
Amoniaco	47,6	135,4	150,2	82,4	62,5	46,6

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de vacuolas subsarcolémicas en muchas fibras musculares, con contenido de material granular fino PAS+. La tinción con miofosforilasa era negativa.

RESULTADOS

Actualmente, el paciente está en fase de adaptación de su estilo de vida a las limitaciones causadas por la intolerancia al ejercicio. Sigue tratamiento psicológico y farmacológico por su depresión reactiva.

La hermana (caso III:6), de 18 años de edad, se queja también de fatiga y mialgias desde los 3 años, con clínica similar a la de su hermano. A la edad de 4 años presentó un cuadro agudo de hiperglicemia, glucosuria y cetonuria coincidiendo con una infección urinaria.

Desde los 13 años presenta fatiga y contracturas musculares al esfuerzo. Ha tenido un total de 10 episodios de mioglobinuria, precisando ser ingresada en Diciembre-01 por un cuadro de rabdomiólisis y mioglobinuria tras ser asaltada en la calle e intentar huir. Refiere una cierta mejoría de los síntomas si descansa dos minutos al aparecer las primeras molestias.

En la actualidad, actividades que requieran ejercicios rápidos, como correr, o ejercicios sostenidos, como exprimir el zumo de dos naranjas, escribir o masticar, le provocan la aparición de los síntomas.

La exploración neurológica era anodina. Su peso era de 49.0 kg. y la talla de 173,0 cm

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 39 segundos. En ese momento la mano quedó contraída, con imposibilidad para extender los dedos completamente.

Los niveles de CK en suero eran de 690 UI/L, aunque en un episodio de rabdomiólisis los valores alcanzaron las 200.000 UI/L. La ALT eran de 29 UI/L y la AST de 99 UI/L. El hemograma y el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	1,06	0,88	0,95	1,03	0,98	0,97
Piruvato	0,08	0,09	0,10	0,08	0,07	0,07
Amoniaco	44,6	89,4	140,4	84,4	52,8	45,8

En el hermano mayor (caso III:4), que ahora tiene 23 años, la sintomatología se inicia a la misma edad que sus hermanos menores. Las actividades no toleradas son las mismas, incluso la masticación. Tiene un *second wind* medio de 4 minutos. Puede pasear despacio durante una hora. Refiere que si está inactivo durante algunas semanas, tiene mayores problemas en la tolerancia al ejercicio. Pesa 65.0 kg. y mide 168,0 cm. Ha presentado unos 25 episodios de mioglobinuria. Se le han detectado repetidamente niveles de CK séricas elevados. En las últimas analíticas, las CK eran de 3196 UI/L, la AST de 54 UI/l y la ALT de 45 UI/L.

El padre (II:5), de 49 años, ha sido siempre un gran deportista y no refiere ninguna sintomatología de la enfermedad. La madre (caso II:6), de 47 años de edad, no presenta ninguna molestia. Tanto la exploración física, test de la isquemia, CK en reposo y lactato durante el ejercicio isquémico fueron normales.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar dos mutaciones en esta familia. Una mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una citosina es substituida por timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el codón CGA cambia a un codón stop (TGA).

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales, la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en otros dos, un fragmento de 146 pb y otro de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado heterocigoto en los individuos III:4, III:5 y III:6.

RESULTADOS

La segunda mutación detectada en esta familia fue la **puntual missense (W797R)** en el exón 20, en la posición c2389, por la que una transición T→C cambia un **TGG** (triptófano) por una **CGG** (arginina). Para detectar la mutación T→C en el exón 20, diseñamos una PCR-RFLP. Un fragmento PCR fue amplificado a partir del ADN genómico, usando el *primer forward* 5'-TTGTACAAGGTGAGGGGTCCT-3' y luego un *primer reverse mismatched* 5'-TTGCCAGAGGTGGCGATGTTTCCTTATCACC ATCCGCGTGC-3' (en negrita el nucleótido *mismatched*).

El fragmento 174 pb obtenido, fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *HhaI* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de agarosa al 2,5%. En presencia de la mutación, la enzima corta el fragmento de 174 pb en dos, uno de 135 pb y otro de 39 pb, mientras que en el ADN normal el fragmento permanece sin cortar.

Esta mutación fue confirmada, mediante PCR-RFLP, en estado heterocigoto en los individuos III:4, III:5, III:6 y II:6.

FAMILIA PYGM-15

Historia de la familia: características y hallazgos clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de una pequeña población de la provincia de Barcelona. Los padres (II:1 y II:2) son originarios de Sant Pere de Torelló (provincia de Barcelona), que en la actualidad tiene censados 2.188 habitantes. Mediante la entrevista, no fue posible determinar la posibilidad de consanguinidad entre los padres.

El caso probando (III: 3), nacido en Sant Pere de Torelló en 1965, refería intolerancia al ejercicio desde la edad de 8 años, se cansaba al montar en bicicleta, correr, subir escaleras, jugar a fútbol o levantar pesos. En una ocasión, se quedó bloqueado mientras participaba en una carrera de 1500 m., apareciendo contracturas y mialgias, teniendo que parar en la mitad del trayecto. Las molestias le duraron dos días. Recuerda tener palpitations y disnea cuando corría. No se acuerda de haber tenido pigmenturia.

A pesar de sus molestias, fue remitido para estudio cuando tenía 29 años. Su *second wind* habitual es de 4 minutos. Actualmente, trabaja en una tienda de accesorios y complementos de muebles, y puede desempeñar su actividad sin problemas siempre y cuando evite llevar pesos, subir cuestas o escaleras y correr

Sus padres (II:1 y II:2), hermanos (III:1 y II:4) y sobrino (IV:1) no presentan síntomas de intolerancia al ejercicio.

La exploración neurológica era normal. La tensión arterial era 120/75 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 68 ppm. El peso era de 72,0 Kg. y la talla de 169,5 cm.

En la exploración neurofisiológica había una estricta indemnidad en los parámetros neurográficos motores y sensitivos. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular. El EMG mostró signos miógenos muy leves en el bíceps braquial, deltoides y cuádriceps.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 43 segundos, después la mano quedó agarrotada y dolorosa.

Los niveles de CK en suero en reposo eran de 579 UI/L (en una ocasión 2.484 UI/L). Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,71	0,93	0,85	1,02	1,13	0,92
Piruvato	0,10	0,12	0,13	0,12	0,11	0,11
Amoniaco	39	205	246	187	52	46

RESULTADOS

Se realizó una biopsia muscular en el músculo bíceps braquial del brazo derecho utilizando la técnica quirúrgica de cielo abierto, que mostró variabilidad en el tamaño de las fibras y presencia de vacuolas subsarcolémicas conteniendo material granular fino PAS positivo. Alguna de las vacuolas estaba vacía. La tinción con miofosforilasa fue negativa.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió la presencia de la mutación **puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una citosina es substituida por timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el codón CGA cambia a un codón stop (TGA).

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte en dos fragmentos, uno de 146 pb y otro de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado homocigoto en el caso probando.

FAMILIA PYGM-16

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. Los padres eran originarios de Mahón, población de Menorca, que en la actualidad tiene censados 23.315 habitantes. No fue posible determinar la posibilidad de consanguinidad entre los padres mediante la entrevista.

El caso probando (II: 6), nacido en Mahón en 1955, refería intolerancia al ejercicio desde la edad de 20 años. Tenía dolores musculares, calambres y cansancio cuando corría, subía escaleras o practicaba actividades deportivas. Los dolores y contracturas le podían durar hasta 3 días. En los últimos cuatro años, ha notado una progresión de intolerancia al ejercicio, siéndole imposible subir más de 15 peldaños de escaleras, subir

caminos con pendiente, pasear más de 1 km. y llevar pesos (refiere por ejemplo, cambiar la bombona de butano). Las contracturas aparecen durante las relaciones sexuales, lo cual le ocasiona severos problemas en su vida matrimonial. Si se esfuerza, aparecen palpitaciones, dolor torácico y sensación de falta de aire. No recuerda haber tenido pigmenturia, pero sí episodios de cólicos nefríticos.

Actualmente, trabaja como transportista conduciendo camiones. Explica que se le quedan agarrotados los músculos de los brazos. Si tiene que bajar y subir varias veces de la cabina del camión, nota dolores intensos en los cuádriceps. Para poder completar la jornada laboral, debe realizar pausas de 3-5 minutos cada dos horas.

La exploración de pares craneales, balance muscular, reflejos profundos, sensibilidad y coordinación era normal. La tensión arterial era 130/70 mm Hg y la frecuencia cardiaca en reposo, 82 ppm. El peso era de 79,5 Kg. y la talla de 171,0 cm.

En la exploración neurofisiológica, había una estricta indemnidad en los parámetros neurográficos motores y sensitivos. No se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular. En el EMG se observó una ausencia de actividad espontánea. En la activación voluntaria, se detectaron patrones interferenciales de características miógenas en la musculatura proximal de las extremidades superiores, con PUM polifásicos, breves y de baja amplitud. En el análisis automático (T/A) se registró una tendencia miógena en deltoides y bíceps braquial, siendo normal el EMG en la musculatura distal de las extremidades superiores. En los músculos proximales habían signos de denervación crónica. El conjunto de hallazgos era sugestivo de un proceso miopático difuso crónico.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 50 segundos. En este momento la mano quedó contracturada y dolorosa, le fue imposible abrir los dedos de la mano.

RESULTADOS

Los niveles de CK en suero, en reposo eran de 590 UI/L. Otros enzimas alterados eran la ALT (138 UI/L) y la AST (56 UI/L). Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,85	0,92	0,93	0,90	0,86	0,87
Piruvato	0,10	0,11	0,13	0,12	0,11	0,11
Amoniaco	37,0	56,4	100,3	81,0	51,9	43,6

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo derecho, que mostró variabilidad en el tamaño de las fibras y presencia de vacuolas subsarcolémicas conteniendo material granular fino PAS positivo. La tinción con miofosforilasa fue negativa.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió la presencia de la mutación **puntual missense (A669V)**. Como consecuencia de una transversión (G→T) en la posición c2006, en el exón 17, una alanina (GCG) es substituida por una valina (GUG) (*Figuras 26 y 27*). La mutación se confirmó usando el *primer reverse 17R*.

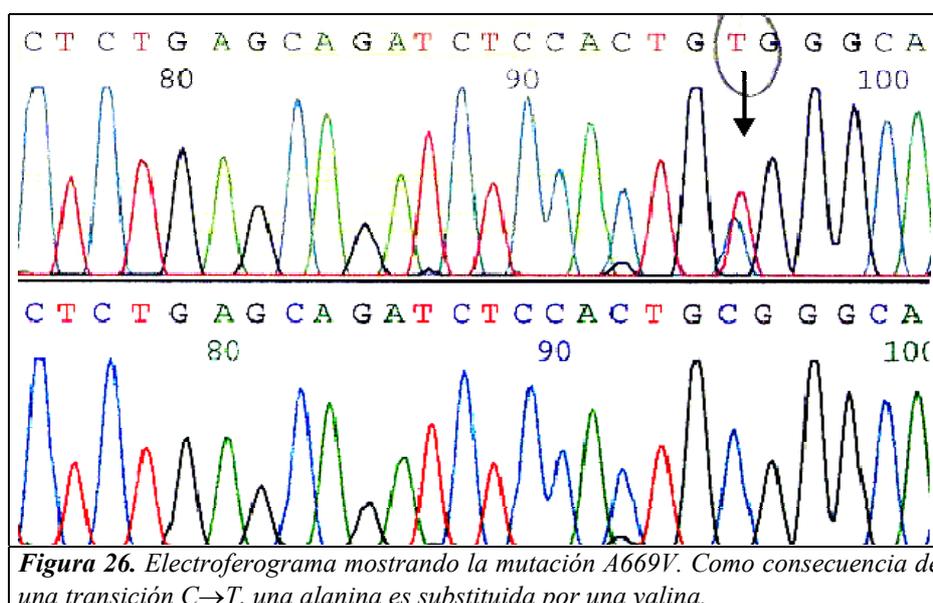


Figura 26. Electroferograma mostrando la mutación A669V. Como consecuencia de una transición C→T, una alanina es substituida por una valina.

Esta mutación fue detectada en estado heterocigoto en el caso probando.

<i>AA posición</i>	664	665	666	667	668	669	670	671	672	672	673	674	675
<i>Paciente</i>	E	Q	I	S	T	V	G	T	E	A	S	G	T
<i>M-Humana</i>	E	Q	I	S	T	A	G	T	E	A	S	G	T
<i>M-Bovina</i>	E	Q	I	S	T	A	G	T	E	A	S	G	T
<i>M-Conejo</i>	E	Q	I	S	T	A	G	T	E	A	S	G	T
<i>M-Ovina</i>	E	Q	I	S	T	A	G	T	E	A	S	G	T
<i>M-Ratón</i>	E	Q	I	S	T	A	G	T	E	A	S	G	T
<i>M-Rata</i>	E	Q	I	S	T	A	G	T	E	A	S	G	T
<i>Drosófila</i>	E	Q	I	S	T	A	G	T	E	A	S	G	T

Figura 27. Alanina 669: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 664 a 675). M= muscular. L= hepática. B= cerebral.

FAMILIA PYGM-17

Historia de la familia: características y hallazgos clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1* y no sugería una posible consanguinidad. La familia materna tenía doble origen: la línea paterna (I:1, I:2 y II:3) era del County Cork (Irlanda) y la materna (I:4) de la isla de Malta, aunque la madre (I:2) había nacido en Calcuta (11.000.000 de habitantes).

El padre y progenitores (II:1, II:2 y III:10) procedía de Ager, una pequeña población de 553 habitantes de la provincia de Lérida.

El caso probando (III: 11), nacida también en Calcuta (India) en 1936, fue estudiada en Wimbledon cuando tenía 47 años de edad por referir una historia de cansancio, dolores y sensación de pérdida de fuerza, de predominio en músculos proximales de las extremidades inferiores. Tenía dificultades para subir escaleras, y además tenía contracturas y dolores musculares al andar rápido. En la exploración física se detectó

RESULTADOS

una debilidad de los músculos proximales de ambas cinturas y una atrofia bilateral de los deltoides. El EMG inicial mostró un patrón miopático, potenciales de fibrilación y unidades polifásicas de corta duración. En las analíticas destacaban unas CK de 1.238 UI/L, siendo normales el resto de parámetros, incluyendo la VSG y los anticuerpos antitejido. De acuerdo con los resultados de la biopsia muscular realizada entonces, de la cual no disponemos informe, se indicó tratamiento con corticoides.

Durante los siguientes cuatro años, la paciente no mejoró en su sintomatología, y los niveles de CK en sangre presentaban disminuciones y elevaciones no relacionadas con cambio de dosificación de la cortisona ni introducción de nuevos fármacos inmunosupresores. Presentó episodios de palpitations con taquicardia (180 ppm) con dolor precordial que fueron estudiados, y solo se detectó esofagitis y hernia de hiato.

Durante estos cuatro años, la VSG siempre se mantuvo como en el momento de diagnóstico, es decir, por debajo de 20 mm/1ª hora.

En 1991, cuando tenía 55 años, la paciente fue revalorada en nuestro centro por empeoramiento de su enfermedad. Tenía dolores musculares en pantorrillas, músculos distales del antebrazo y musculatura paravertebral. Reinterrogada, explicaba que ya a la edad de 14 años, tenía intolerancia al ejercicio, con dolores en los muslos y pantorrillas cuando corría que le obligaban a parar. Ya de mayor, explicaba, que cuando trabajaba tenía dolores en hombros y brazos, con sensación de hinchazón y agarrotamiento de los músculos distales del antebrazo al sostener pesos. No recuerda episodios de pigmenturia.

La exploración mostró un aspecto cushingoide, una debilidad con balance 4+/5 en músculos proximales de ambas cinturas y extensores del cuello. El balance en el resto de músculos era normal. Se confirmó la atrofia deltoidea bilateral. El resto de exploración neurológica fue normal. La tensión arterial era 140/80 mm Hg. y la frecuencia cardiaca en reposo de 94 ppm. Su peso era de 70,0 Kg. y la talla de 160,0 cm.

En el test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 49 segundos. En ese momento la mano quedaba agarrotada y dolorosa, siéndole imposible abrir plenamente los dedos de la mano.

Los niveles de CK en suero, en reposo, eran de 856 UI/L. Otros enzimas alterados eran la AST (41 UI/L) y la ALT (49 UI/L). Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,80	0,85	0,89	0,83	0,82	0,80
Piruvato	0,09	0,10	0,12	0,09	0,09	0,08
Amoniaco	42,4	59,6	123,2	84,2	50,9	43,3

Se realizó una nueva biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto, en el músculo bíceps braquial del brazo derecho, que mostró variabilidad en el tamaño de las fibras con presencia de fibras redondeadas, y de fibras necróticas y signos regenerativos. Abundantes núcleos centrales y numerosas vacuolas de diferentes tamaños. En ocasiones las vacuolas ocupaban todo el citoplasma. El contenido vacuolar era PAS positivo. La tinción con miofosforilasa fue negativa.

El análisis de la secuencia codificante del gen de la PYGM, realizado hasta al momento, ha permitido descartar las tres mutaciones más frecuentes en nuestro medio: R49X, W797R y G204S. Falta completar el estudio de la totalidad de la secuencia codificante del gen de la PYGM

FAMILIA PYGM-18

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de una población de la provincia de Soria. Tanto el padre (I:1) como la madre (I:2), eran originarios de Huertales, un pequeño pueblo de Soria. Este núcleo de población, junto a otros cinco, pertenece al municipio de Villar del Río que tiene en la actualidad 186 habitantes censados. No pudimos demostrar mediante la entrevista, una posible consanguinidad.

El caso índice (II:12), una religiosa nacida en Barcelona en 1929, fue remitida para su estudio cuando tenía 72 años. Desde la edad de 50 años, refería intolerancia al ejercicio y cansancio, especialmente al subir escaleras, agacharse, llevar pesos o andar deprisa. Durante estas actividades tenía dolores musculares y contracturas que podían durar hasta dos días. Si en el momento de aparecer los primeros síntomas descansaba 5 minutos, podía reanudar el ejercicio. No recuerda episodios de pigmenturia.

No obstante, podía subir escaleras hasta el segundo piso, andar durante 10 minutos, barrer, hacer las camas, cuidar el jardín y otras actividades domésticas que no precisasen esfuerzo.

El balance muscular, así como el resto de la exploración neurológica eran estrictamente normales. La tensión arterial era de 165/95 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 68 ppm. Su peso era de 53,5 Kg. y la talla de 160,0 cm.

El estudio neurofisiológico mostró una normalidad en los parámetros neurográficos. Tampoco se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular. El EMG no detectó signos de miopatía.

En el test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 42 segundos. En este momento, la mano quedó contracturada, siéndole imposible extender totalmente los dedos de la mano.

Los niveles de CK en suero eran de 1940 UI/L, aunque en un episodio de rabdomiólisis llegaron a 7146 UI/L. La AST eran de 83 UI/L y la ALT de 72 UI/L). Tanto el hemograma como resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del ejercicio isquémico, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	1,02	1,04	1,10	1,07	1,03	1,01
Piruvato	0,09	0,11	0,12	0,11	0,10	0,08
Amoniaco	22,0	88,2	182,6	70,2	41,8	25,6

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de una variabilidad en el tamaño de las fibras. Presencia de fibras con núcleos centrales y vacuolas subsarcolémicas. El contenido de las vacuolas era PAS positivo. La tinción con mifosforilasa era negativa.

En la familia, una hermana (caso II:11) fallecida a los 74 años por una neoplasia de colon, presentaba síntomas similares a ella, aunque no disponemos de más información al respecto.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar la presencia de la **mutación puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145. Una citosina es substituida por una timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el codon CGA cambia a un codón stop (TGA).

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones

normales, la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en dos fragmentos: uno de 146 pb y otro de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado homocigoto.

FAMILIA PYGM-19

Historia de la familia: características y hallazgos clínicos. En esta familia (*figura XX*), el padre (II:1) era originario de Celeiro (Lugo), población con 400 habitantes. La madre (II:2) era de Porto de Bares, una pequeña población que junto con otras cuatro parroquias está englobada en el municipio de Mañón (Coruña), que tiene una población de 1.870 habitantes. No pudimos demostrar consanguinidad mediante la entrevista, aunque ambas poblaciones están cercanas, separadas tan solo por 24 km.

No constan otros familiares afectos. El hermano mayor (III:1) falleció a la edad de 23 años a consecuencia de politraumatismo.

El caso índice (III: 2), nacido en Algorta (Vizcaya) en 1917, fue remitido para su estudio cuando tenía 76 años. Refería debilidad e intolerancia al ejercicio desde la infancia. Desde la edad de 9 años, cada vez que realizaba un esfuerzo físico, aparecían dolores y contracturas musculares con cansancio que le obligaban a interrumpir la actividad. A pesar de su enfermedad, pudo prestar el servicio militar en el frente durante la guerra civil y desempeñar su actividad laboral (modelista de fundición) con normalidad hasta la edad de jubilación. No recuerda episodios de pigmenturia. Su tiempo de *second wind* era de unos 3 minutos.

La enfermedad había progresado lentamente, pero en los dos últimos años notaba una pérdida de fuerza y atrofia musculares de predominio proximal de las extremidades superiores, motivo por el cual acudió a consultas.

En la exploración física había una escápula alada y atrofia de los músculos supraespinoso, infraespinoso y deltoides, más marcada en el lado izquierdo. En el examen del balance muscular, se observó una debilidad que afectaba a los flexores del cuello (4+/5), pectoral, deltoides, bíceps y tríceps braquiales izquierdos (4+/5), paravertebrales y abdominales (4+/5). En el resto de músculos, el balance era normal. El resto de la exploración neurológica era normal, a excepción de una hipoacusia y parálisis facial derechas.

La tensión arterial era 150/70 mm Hg. La frecuencia cardiaca en reposo era de 64 ppm. El peso era de 63,4 Kg. y la talla de 165,0 cm.

El estudio neurofisiológico mostró normalidad en los parámetros neurográficos. Tampoco se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular. El EMG detectó alteraciones mixtas con patrones claramente miopáticos en algunos músculos y signos de denervación en otros, sugiriendo una miopatía discreta de larga evolución.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 35 segundos. En ese momento la mano quedaba agarrotada, siéndole imposible abrir los dedos de la mano, precisando ayudarse con la otra mano.

Los niveles de CK en suero eran de 3050 UI/L. Otros parámetros alterados fueron: AST 61 UI/L, ALT 59 UI/L y ácido úrico de 8,7 mg/dl. Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del ejercicio isquémico, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	1,06	1,10	1,18	1,09	1,00	1,02
Piruvato	0,09	0,11	0,12	0,11	0,10	0,08
Amoniaco	28,8	138,9	191,9	84,9	50,9	37,2

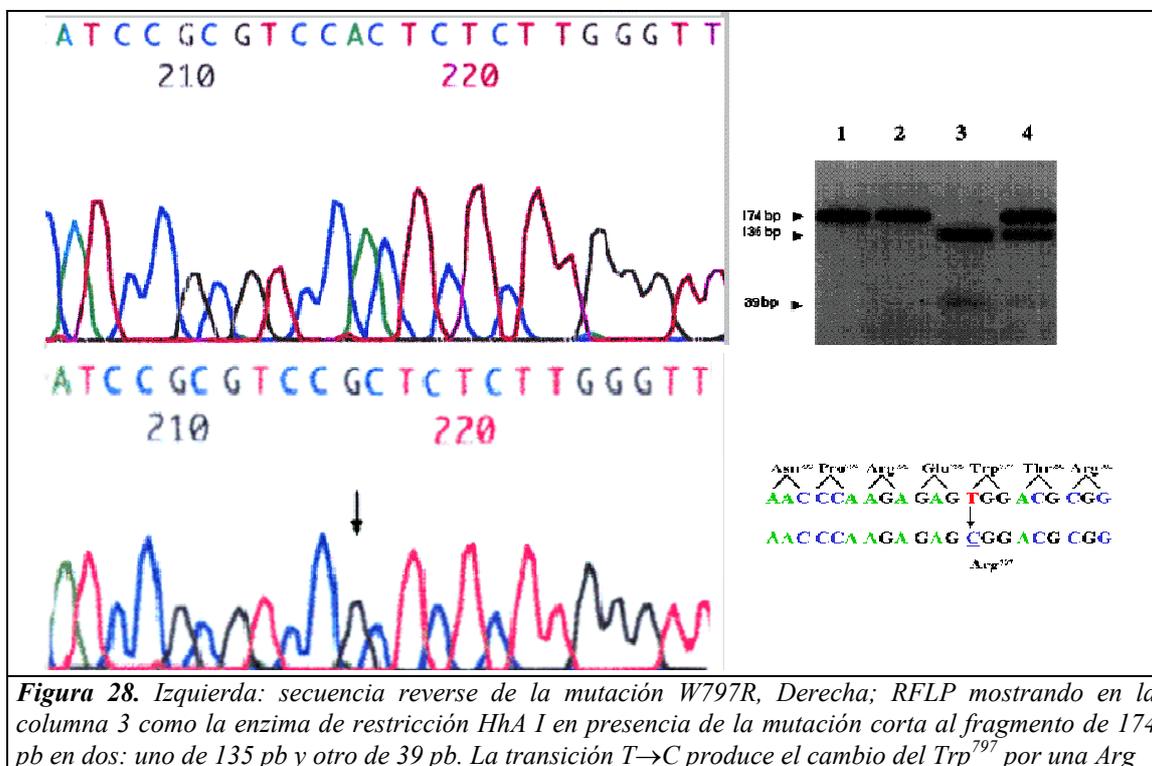
Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de un número

RESULTADOS

importante de fibras con vacuolas subsarcolémicas de tamaño variable. En algunas ocasiones, las vacuolas ocupaban la totalidad de las fibras. El contenido era PAS positivo. Se visualizó un número importante de fibras anulares de pequeño tamaño y redondeadas. La tinción con miofosforilasa era negativa.

Ninguna de sus dos hijas (IV:1 ,y IV:3) presenta intolerancia al ejercicio.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar la presencia de la **mutación puntual missense (W797R)** en el exón 20, en la posición c2389, por la que una transición T→C cambia un **TGG** (triptófano) por una **CGG** (arginina). Para detectar la mutación T→C en el exón 20, diseñamos una PCR-RFLP. Un fragmento PCR fue amplificado a partir del ADN genómico usando el *primer forward* 5'-TTGTACAAGGTGAGGGGTCCT-3' y luego un *primer reverse mismatched* 5'-TTGCCAGAGGTGGCGATGTTCTTATCACC ATCCGCGT**G**C-3' (en negrita el nucleótido *mismatched*) (Figuras 28 y 29).



<i>AA posición</i>	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802
<i>PacienteW797R</i>	L	Y	K	N	P	R	E	R	T	R	M	V	I
<i>M-Humana</i>	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
<i>M-Bovina</i>	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
<i>M-Conejo</i>	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
<i>M-Ovina</i>	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
<i>M-Raton</i>	L	Y	K	N	P	R	E	W	T	R	M	V	I
<i>B-Human</i>	L	Y	R	N	P	K	E	W	T	K	K	V	I
<i>L-Human</i>	L	Y	M	N	P	K	A	W	N	T	M	V	L

Figura 29. Triptofano 797: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 482 a 496). *M*= muscular. *L*= hepática. *B*= cerebral.

El fragmento 174 pb obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción endonucleasa *HhaI* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de agarosa al 2,5%. En presencia de la mutación, la enzima corta el fragmento de 174 pb en dos, uno de 135 pb y otro de 39 pb, mientras que en el ADN normal el fragmento permanece sin cortar.

Esta mutación fue confirmada, mediante la PCR-RFLP, en estado homocigoto.

FAMILIA PYGM-20

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia es originaria de Premiá de Mar (Barcelona). Tanto la madre como el padre (I:2 y I:1) ya fallecidos, eran originarios de esta población, que tiene censados unos 26.334 habitantes. No pudimos demostrar consanguinidad mediante la entrevista. Obtuvimos información correspondiente a miembros de tres generaciones del pedigrí.

RESULTADOS

El caso índice (II: 1), nacido en Barcelona en 1946, fue remitido para su estudio cuando tenía 55 años. Había practicado deporte con regularidad hasta 1982 sin problemas, aunque siempre se le habían detectado las transaminasas elevadas en las revisiones médicas de la empresa donde trabaja. En 1997, cuando tenía 51 años, presentó su primer episodio de mioglobinuria con contracturas musculares tras realizar un esfuerzo intenso (subir las escaleras de los siete pisos de su vivienda por avería en el ascensor). Desde entonces, nota que aquellas actividades que requieren correr, subir escaleras o llevar pesos en los brazos, le provocan la aparición de molestias musculares. En total, recuerda 4 episodios de mioglobinuria. Su *second wind* es aproximadamente de 2 minutos. Puede desempeñar su actividad laboral (trabaja como administrativo) con normalidad.

El balance muscular, así como el resto de la exploración neurológica, eran estrictamente normales. La tensión arterial era 145/80 mm Hg y la frecuencia cardiaca, en reposo, de 72 ppm. Su peso era de 75,5 Kg y la talla de 174,0 cm.

El estudio neurofisiológico mostró una normalidad en los parámetros neurográficos. Tampoco se detectaron alteraciones en la transmisión neuromuscular. El EMG detectó trazados de neuromiotonía en los músculos de las piernas.

En test de la isquemia, sólo podía aguantar el ritmo durante 49 segundos. En ese momento, la mano quedaba contracturada, siéndole imposible abrir los dedos de la mano, precisando ayudarse con la otra mano.

Los niveles basales de CK en suero eran de 711 UI/L aunque en una ocasión se alcanzaron valores de 4.107 UI/L. Tanto el hemograma como el resto de determinaciones bioquímicas del protocolo fueron normales.

En el test del ejercicio isquémico, no se observó elevación en el lactato ni en el piruvato, siendo la curva de amoniaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,88	0,80	0,88	0,86	0,85	0,88
Piruvato	0,08	0,07	0,09	0,08	0,10	0,08
Amoniaco	42,7	147,0	152,6	63,6	48,8	40,6

Se realizó una biopsia muscular, mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de una variabilidad en el tamaño de las fibras con presencia de núcleos centrales. Lo más llamativo era la presencia de vacuolas subsarcolémicas con contenido de material PAS+. La tinción con miofosforilasa era negativa.

Los dos hijos (III:1 y III:2) y el hermano (II:3) no presentan molestias musculares, aunque su madre, fallecida a la edad de 76 años, se quejaba de síntomas similares, presentando fatiga a pequeños esfuerzos. El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar la presencia de la **mutación puntual nonsense (R49X)** en el exón 1, en la posición c145, en la que una citosina es substituida por timina (C→T). Como consecuencia de esta transición, la arginina codificada por el codón CGA cambia a un codón stop (TGA).

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RFLP. El fragmento 475-bp del exón 1 obtenido, fue sometido a digestión con la enzima de restricción *NlaIII* (*New England Biolab, Beverly, MA*) y analizado en un gel de poliacrilamida al 12%. En condiciones normales, la enzima corta el fragmento en dos fragmentos de 158 pb y de 317 pb. En presencia de la mutación, se genera un nuevo sitio de restricción en el fragmento de 317 pb, resultando un corte de este fragmento en otros dos fragmentos: uno de 146 pb y otro de 171 pb.

Esta mutación fue detectada en estado heterocigoto.

FAMILIA PYGM-21

Historia de la familia: características y hallazgos Clínicos. El pedigrí se muestra en la *figura 1*. La familia tiene procedencias geográficas diferentes. El padre del caso probando (II:6), es originario de la población de Colmenar, en la provincia de Málaga, que tiene una población de 3.073 habitantes. La madre (II:5), es originaria de la población Fábricas de Riópar, un municipio de 1.455 habitantes en la provincia de

RESULTADOS

Albacete. No fue posible detectar indicios sugestivos de consanguinidad a través de la entrevista.

Estudiamos a los siguientes miembros de la familia:

II:5, II:6, III:1 y III:3.

El caso índice (III:1), nacido en Barcelona en 1970, fue remitido para su estudio cuando tenía 16 años a raíz de un episodio de pérdida de conciencia y mioglobinuria después de realizar ejercicio intenso. Desde la infancia, alrededor de los 8 años, presentaba fatiga, contracturas y dolores musculares durante casi todas las actividades deportivas. Tenía especialmente intolerancia en el “*sprint*” y velocidad. Durante la realización de ejercicios físicos intensos y sostenidos (subir cuestas, escaleras, hacer flexiones, hacer abdominales, jugar a fútbol o baloncesto, caminar rápido, trabajar con los brazos en alto, mover muebles, llevar en hombros a su hijo, llevar pesos, actividades que requieran doblar la cintura) aparecían los síntomas. Recuerda sólo dos episodios de mioglobinuria.

Su frecuencia cardíaca aumenta con facilidad, ya en las fases iniciales del ejercicio, hasta valores de 140 ppm o más. Explicaba que tras un descanso de 3 a 5 minutos, podía reanudar el ejercicio sin problemas, aunque su fase de adaptación puede durar hasta 2 horas.

Con el tiempo, ha mejorado su resistencia a estos ejercicios, gracias a unos minutos previos de calentamiento. Si realiza un precalentamiento previo de 10-20 minutos, puede nadar una distancia de 3 km.

Actualmente, las molestias musculares peor toleradas son las que afectan a los músculos paravertebrales. Las contracturas pueden persistir hasta tres días. Puede desarrollar su actividad profesional que requiere viajar con frecuencia sin problemas.

En la exploración física, el balance muscular, reflejos, sensibilidades y el resto de la exploración eran normales. La tensión arterial era 120/85 mm Hg y la frecuencia

cardíaca en reposo de 72 ppm. Su peso era de 70,5 Kg. y la talla de 172 cm. En la exploración neurofisiológica, la neurografía motora y sensitiva era absolutamente normal. El EMG mostraba patrones electromiográficos, caracterizados por la presencia de actividad espontánea en forma de fibrilación y aumento de polifásicos, hallazgos compatibles con un proceso miógeno. Con la isquemia del miembro, el patrón electromiográfico perdía amplitud durante las activaciones repetidas hasta su práctica desaparición, coincidiendo con la contractura clínica.

La estimulación repetitiva a 20/50 ciclos por segundo durante 2 minutos, no mostró decremento alguno significativo ni potenciación patológica.

En test de la isquemia, podía aguantar el ritmo durante 43 segundos. En ese momento la mano quedaba agarrotada.

Los niveles de CK en suero eran, en reposo, de 640 UI/L, aunque en uno de los episodios de mialgias post-ejercicio presentó cifras de 7.986 UI/L. Se detectaron también cifras elevadas de la AST 61 UI/L, ALT de 55 UI/L. El hemograma, ionograma, glucemia, urea, proteínas y ácido úrico estaban dentro de los valores normales.

En el test del lactato, no se observó elevación del lactato ni del piruvato, siendo la curva de amoníaco normal. Los resultados de la curva fueron:

Prueba/tiempo	Basal	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
Lactato	0,67	0,54	0,70	0,77	0,81	0,77
Piruvato	0,09	0,12	0,13	0,12	0,10	0,10
Amoniaco	36,6	159,8	144,4	68,8	44,2	38,0

Se realizó una biopsia muscular mediante la técnica quirúrgica de cielo abierto en el músculo bíceps braquial del brazo izquierdo, que mostró la presencia de una cierta variabilidad en el tamaño de las fibras y presencia de algunas fibras con núcleos centrales únicos. Observamos la presencia de algunas fibras, habitualmente agrupadas, con signos de degeneración y miofagia que iban acompañadas de cierto grado de

RESULTADOS

infiltrado inflamatorio intersticial. Lo más llamativo fue que numerosas fibras tenían vacuolas de situación generalmente subsarcolémicas y no tan a menudo, intracitoplasmática con tendencia a confluir. El material contenido en las vacuolas era PAS positivo y diastasa sensible. En algunas fibras del tipo II, había pequeños cuerpos ovoides o redondeados intracitoplasmáticos o subsarcolémicos, muy eosinófilos, birrefringentes, únicos o múltiples. La tinción con miofosforilasa era negativa.

Su hermana (III:3), de 25 años de edad, goza de perfecto estado de salud, no se queja de molestias musculares ni de intolerancia al ejercicio. La exploración física fue estrictamente normal. En los estudios bioquímicos y hematológicos, las CK eran normales (27 UI/L) así como el resto de parámetros analizados en el protocolo.

Sugirió realizarse la curva de ejercicio en isquemia, con los siguientes valores normales:

Prueba/tiempo	Basal	1 min	3 min	5 min	10 min	20 min
Lactato	0,88	3,38	2,78	2,32	1,41	0,82
Piruvato	0,14	0,36	0,30	1,66	1,20	1,10
Amoniaco	22,8	120,4	142,6	84,4	42,4	24,2

El padre (II:6), de 56 años, explicaba que en los últimos años notaba agarrotamiento muscular al realizar ejercicios repetidos o mantenidos en la misma postura. Como ejemplo, explicaba que estas contracturas aparecían al mantener apretada la empuñadura de una lima mientras la utilizaba.

La exploración física en la madre (II:6), de 48 años, era completamente normal. Los valores de CK eran 36 y 74 UI/L respectivamente.

El análisis de la secuencia completa codificante del gen de la PYGM, permitió identificar dos mutaciones (una de ellas nueva) en esta familia.

Una mutación puntual *missense* (G204S) en el exón 5, en estado heterocigoto, en la posición c610, en la que una guanina es substituida por adenina (G→A). Como consecuencia de esta transición, la glicina codificada por el trinucleótido **G**GC cambia a una serina (**A**GC).

Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RCLP. El fragmento 87-bp obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción *Cfr*I (*Fermentas*®, USA.) y analizado en un gel de agarosa al 2,5%. En presencia de la mutación, el producto PCR de 87 bp permanece sin cortar, mientras que en su ausencia, el ADN normal (wild type) es clavado en dos fragmentos más pequeños de 29 pb y 58 pb. Para confirmar la presencia de esta mutación y excluir la posibilidad de mutaciones en los codones 203 o 205, los cuales podrían abolir el sitio de *Cfr*I), secuenciamos el producto PCR directamente con el kit de secuenciación *ABIDyeDeoxy Terminator Cycle*.

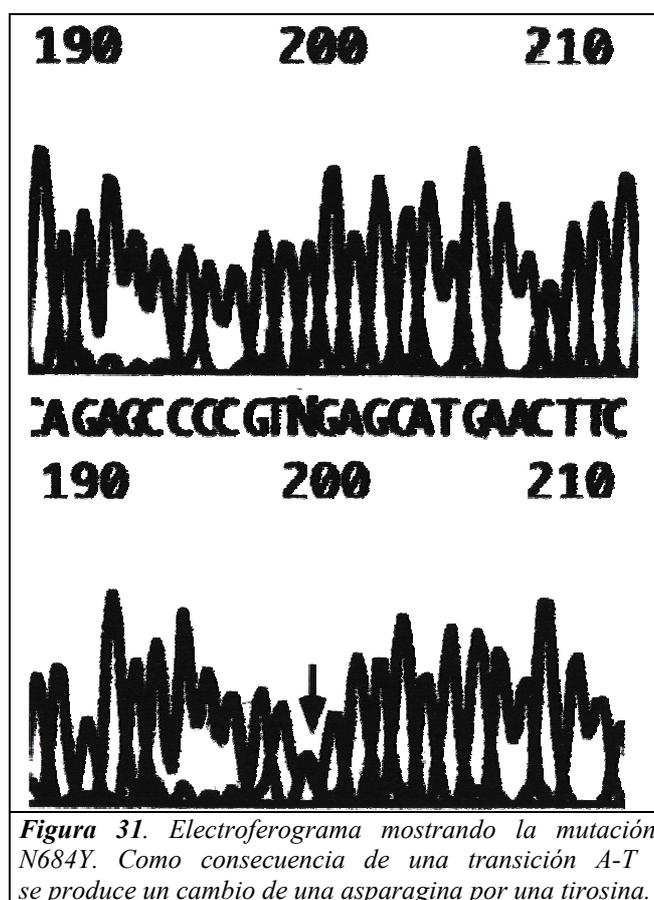
Esta mutación fue detectada en estado heterocigoto en el caso probando (III:1) y en su padre .

El carácter patógeno de la mutación nonsense G204S está fundamentado en los siguientes hallazgos: 1) la glucina en la posición 204 está implicada en la dimerización de los monómeros de la glucógeno fosforilasa (Burke 1987). 2) La glicina en la posición 204, está altamente conservada en las glucógeno-fosforilasas de las diferentes especies (*Figura 30*). 3) El carácter patogénico de esta mutación fue reportado por primera ocasión en 1993 (Tsuji 1993) en 8 pacientes anglosajones y posteriormente en otros grupos étnicos.

<i>AA posición</i>	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
<i>Paciente</i>	P	V	H	F	Y	S	H	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Humana</i>	P	V	H	F	Y	G	H	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Bovina</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Conejo</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Ovina</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Ratón</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>M-Rata</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	S	Q
<i>B-Humana</i>	P	V	H	F	Y	G	R	V	E	H	T	P	D

Figura 30. Glicina: aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 199 a 211). M= muscular. L= hepática. B= cerebral.

El segundo error genético presente en esta familia, era una **mutación puntual missense (N684Y)** en el exón 17, en estado heterocigoto, en la posición c2050, en la que una adenina es substituida por una timina (A→T). Como consecuencia de esta transversión, la asparagina codificada por el trinucleótido AAC cambia a una tirosina TAC). (*Figura 31*).



Esta mutación fue confirmada mediante la PCR-RCLP. El fragmento 259-bp obtenido fue sometido a digestión con la enzima de restricción *HhaI* (*New England Biolabs, Beverly, MA*), y analizado en un gel de agarosa al 2,5%. En presencia de la mutación, el producto PCR de 259 pb es cortado en dos fragmentos de 220 pb y 39 pb, mientras que en el ADN normal (wild type) el fragmento el producto PCR de 259 pb permanece sin cortar.

Esta mutación fue detectada en estado heterocigoto en el caso probando (III:1), en la hermana (III:2) y en la madre (II:5).

El carácter patógeno de la mutación nonsense N684Y, está fundamentado en los siguientes hallazgos: 1) la asparagina es un aminoácido neutral, substituido por un aminoácido aromático (tirosina) que puede alterar la estructura secundaria del enzima. 2) Además, la asparagina actúa como ligando de residuos fosfato piridoxal en el dominio catalítico, y su substitución por tirosina podría afectar la función catalítica alterando la unión con el cofactor. La asparagina en la posición 684 está altamente conservada en las glucógeno-fosforilasas de las diferentes especies (*Figura 32*).

<i>AA posición</i>	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691
<i>Paciente</i>	M	K	F	M	L	Y	G	A	L	T	I	G	T
<i>M-Humana</i>	M	K	F	M	L	N	G	A	L	T	I	G	T
<i>M-Bovina</i>	M	K	F	M	L	N	G	A	L	T	I	G	T
<i>M-Conejo</i>	M	K	F	M	L	N	G	A	L	T	I	G	T
<i>M-Ovina</i>	M	K	F	M	L	N	G	A	L	T	I	G	T
<i>M-Ratón</i>	M	K	F	M	L	N	G	A	L	T	I	G	T
<i>M-Rata</i>	M	K	F	M	L	N	G	A	L	T	I	G	T
<i>B-Humana</i>	M	K	F	M	L	N	G	A	L	T	I	G	T
<i>Patata</i>	M	K	F	A	M	N	G	C	I	Q	I	G	T
<i>Levadura</i>	M	K	F	V	M	N	G	G	L	I	I	G	V
<i>E.Coli</i>	M	K	F	A	L	N	G	A	L	T	I	G	T

Figura 32. Asparagina 684, un aminoácido altamente conservado en las fosforilasas de diferentes especies. (Secuencia de los AA comprendidos entre las posiciones 679 a 691). **M**= muscular. **L**= hepática. **B**= cerebral.

4.2.- RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA SERIE POR INDIVIDUOS.

4.2.1.- VARIABLES DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES.

De los 35 pacientes estudiados, 20 eran varones y 15 mujeres. La relación hombre/mujer en nuestra serie fue de 1,33. Al estudiar el comportamiento de las variables cuantitativas demográficas estudiadas con relación al factor sexo, no obtuvimos diferencias significativas.

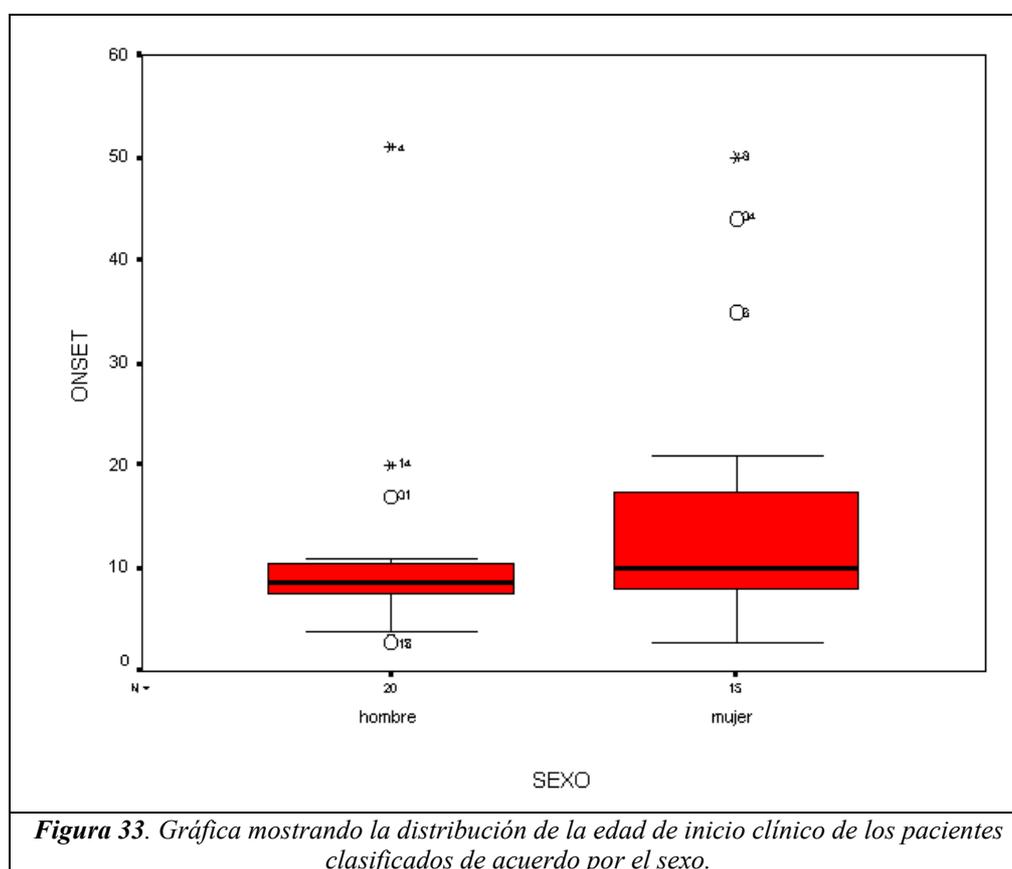
La **edad media de los pacientes** era de 42,74 años, con una desviación típica (SD) de 15,9. Otros parámetros estadísticos estudiados fueron: mediana de 40,0 años, rango de 67, con un mínimo de 18 años y un máximo de 85. En los varones, la edad media era de 42,25 años (SD 14,93) y en las mujeres era de 43,0 (SD 17,66). El test *t* de Student de comparación de medias para muestras independientes (hombres y mujeres) fue no significativo. ($t = -0,082$; $p = 0,935$).

En cuanto a la **edad de inicio de los síntomas**, la edad media de presentación del síntoma inicial fue 13,31 años (SD 12,51), la mediana de 10,0 años y el rango estaba comprendido entre 3 y 51 años. Cuando estudiamos la influencia del sexo en el debut de los síntomas, observamos que en los hombres, la edad media de presentación era de 11,1 años (SD 10,23) y en las mujeres de 16,27 años (SD 14,90) (*Figura 33*). A pesar de estas diferencias, el test estadístico *t* de comparación de medias fue no significativo ($t = -1,217$; $p = 0,232$).

Al analizar el **momento en que se hizo el diagnóstico clínico**, la edad media para el grupo fue de 36,26 años (SD 16,31), la mediana 34,0 y el rango estaba comprendido entre 16 y 76 años. En los hombres, el diagnóstico se hizo en una edad media de 36,0 años (SD 14,65). En las mujeres, a los 36,6 años (SD 18,01). No habían diferencias significativas entre hombres y mujeres ($t = -0,106$; $p = 0,916$).

Considerando el grupo en su totalidad, el **tiempo medio transcurrido entre el debut de los síntomas y el momento del diagnóstico clínico**, era de 23,86 años (SD 14,13).

La mediana era de 20,0 años y el rango de 4 a 66. En los varones, el tiempo medio era de 24,9 años (SD 14,65). En las mujeres, era de 22,47 (SD 13,78). El test estadístico t de comparación de medias tampoco era significativo ($t = 0,499$; $p = 0,621$).



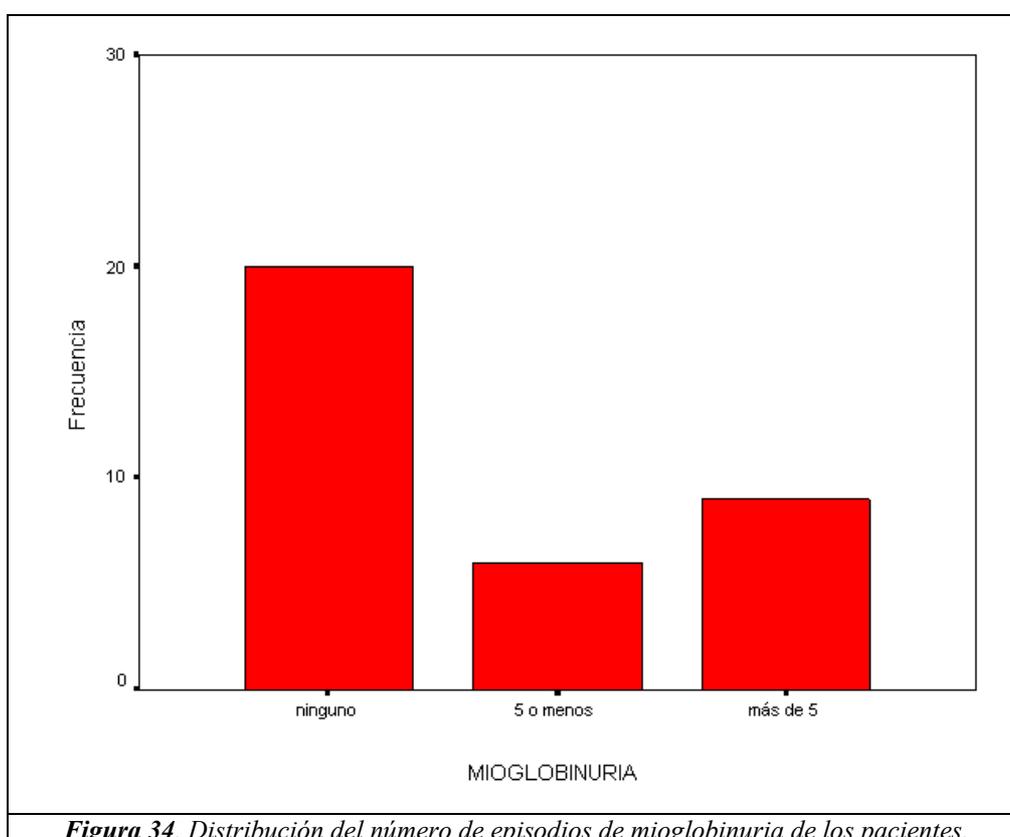
4.2.2.- VARIABLES CLINICAS DE LOS PACIENTES

4.2.2.1 EPISODIOS DE MIOGLOBINURIA

Quince pacientes (42,9%) reconocían haber presentado pigmenturia. Seis pacientes (17,1%) recordaban haber presentado menos de 5 episodios. Los otros nueve (25,7%), habían tenido más de cinco episodios (*Figura 34*). No observamos diferencias al analizar la influencia del sexo, edad o tipo de mutaciones. La mayoría de revisiones afirman que la mioglobinuria ocurre aproximadamente en el 50% de los pacientes con la enfermedad. Tampoco es un hallazgo que refleje la agresividad de la forma clínica o de

la mutación responsable. El que un paciente presente o no mioglobinuria depende de las características del ejercicio o actividad realizada.

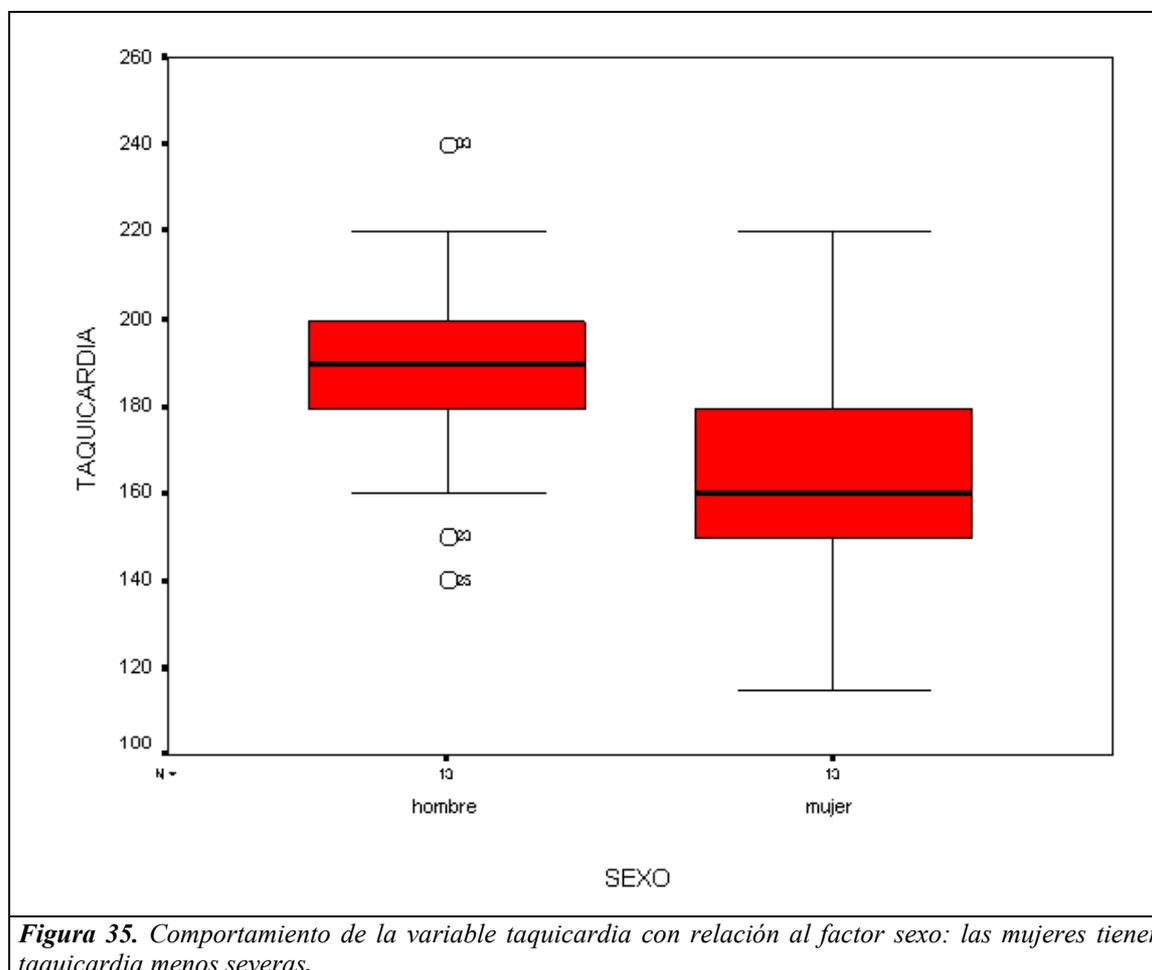
Al estudiar el comportamiento de la esta variable de forma cualitativa (ausencia o presencia de mioglobinuria) con relación al factor sexo, mediante el cálculo de las tablas de contingencia y el test χ^2 mostró diferencias significativas ($p = 0,007$, con corrección de Yates), con lo que puede aceptar una clara dependencia entre estos dos factores.



4.2.2.2.- TAQUICARDIA

Cuando estudiamos el comportamiento de esta variable con relación al factor sexo, el test de comparación de medias mostró la existencia de diferencias significativas ($t= 2,149$; $p= 0,042$), que fue comprobado mediante la utilización de un contraste no

paramétrico, la prueba U de Mann-Whitney, que dio una $U = 44,5$ y una $p = 0,039$. (Figura 35)



4.2.2.3.- SECOND WIND Y RESISTENCIA EN EL TEST ISQUÉMICO

Aunque el concepto de *second wind* depende de la rapidez con que se utilizan las otras fuentes de energía, su duración está relacionada con el entrenamiento del paciente para el ejercicio y con las características de la actividad. Es difícil estandarizar los tiempos de descanso para poder reanudar el ejercicio.

El tiempo medio de descanso para continuar nuevamente sin problemas una actividad física estandarizada, era de 5,97 minutos, con una SD de 3,55, una mediana de 5 minutos y un rango comprendido entre 1 y 15 minutos.

En las mujeres, el tiempo necesario para reanudar sin problemas la actividad era 5,43 minutos y en los hombres 6,35 minutos. No había diferencias estadísticamente significativas al analizar el comportamiento de esta variable con relación al factor sexo ($t= 0,739$; $p= 0,465$).

Cuando analizamos la resistencia en el test isquémico del antebrazo, el valor medio era de 41,6 segundos, con una SD de 5,93, una mediana de 42,0 y un rango de 22. En las mujeres, el valor medio era de 42,47 segundos y en los hombres 40,95. Tampoco hubo diferencias significativas según el sexo ($t=-0,736$; $p= 0,467$).

No obtuvimos diferencias significativas al analizar el efecto del sexo sobre la duración del *second wind* ni la resistencia al test isquémico.

4.2.2.4.- REPERCUSION SOBRE LA ACTIVIDAD LABORAL

En cinco (14,28%) de los pacientes en edad laboral, la enfermedad les imposibilitaba el desarrollo de su trabajo. Aunque no se pueden comparar las actividades entre sí, llama la atención que la limitación afecte casi por igual tanto a profesiones que requieren esfuerzo físico como a las que no lo requieren. La edad media en que se producía la invalidez era de 38,4 años.

4.2.3 VARIABLES BIOQUÍMICAS

4.2.3.1 PARAMETROS BIOQUIMICOS DE RUTINA

Las **CK en reposo** estaban aumentadas en todos los pacientes aunque con un intervalo muy amplio. El valor medio era de 1914,43 UI/L, con una SD de 2005,99, una mediana de 1097,0 y rango comprendido entre 298 y 9740.

En las mujeres, la media era de 1271,47 UI/L (SD 818,08) y en los hombres de 2396,65 UI/L (SD 2477,21).

El **valor máximo medio observado de la concentración de CK** en sangre, fue de 14199 UI/L cuando consideramos al grupo. En las mujeres era de 16885 UI/L y en los hombres 12185 UI/L.

Los valores de las CK séricas varían en un mismo paciente, tanto en reposo como después del ejercicio. No son valores suficientemente demostrativos para establecer comparaciones y conclusiones sobre la patogenicidad de una mutación concreta.

Respecto a las **transaminasas**, el valor medio era de 76,46 UI/L para la AST y 54,54 UI/L para la ALT. Los valores medios para los varones eran de 69,45 UI/L y 60,55 UI/L, respectivamente. En las mujeres, 85,8 UI/L para la AST y 46,53 UI/L para la ALT.

Nueve de los pacientes presentaban una **uricemia** superior a 7,0 mg/dl. El valor medio de la serie era de 5,88 mg/dl (SD 1,7) y un rango comprendido entre 2,7 y 8,8. En los hombres el valor medio fue 6,72 y en las mujeres 4,72.

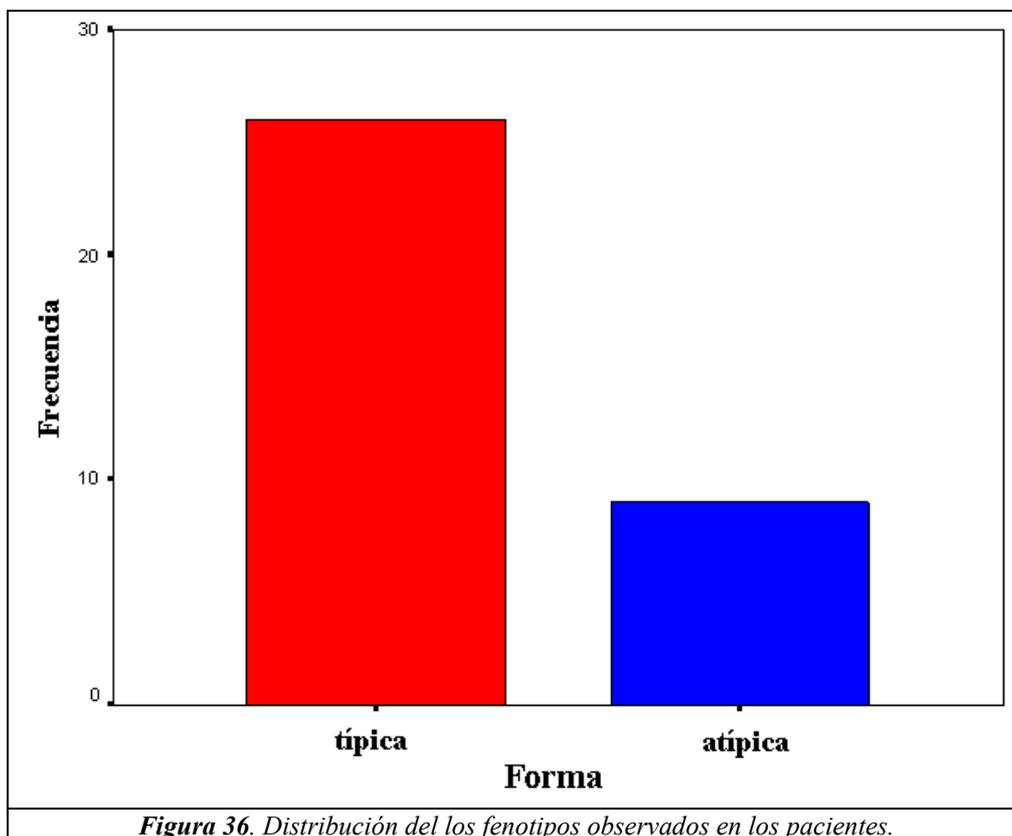
4.2.3.2 CURVA DE LACTATO, PIRUVATO Y AMONIACO

En los 35 pacientes (100%) las concentraciones de lactato y piruvato no sufrieron incremento en las determinaciones seriadas del test del ejercicio isquémico del antebrazo. La curva plana de lactato y piruvato, iba acompañada de un incremento en las concentraciones de amoniaco, lo que confirmaba que el paciente había realizado el suficiente ejercicio.

4.2.4.- FENOTIPOS OBSERVADOS

El **fenotipo típico** fue el más observado en nuestros pacientes (74,3%). De los nueve pacientes que no presentaron la forma clínica típica, cinco (14,28%) fueron formas de debut adulto, dos en forma de dolor torácico, una en forma de dolor abdominal agudo y otra en forma de fallo renal (figura 36).

En seis familias, el patrón era **pseudodominante** por la presencia de individuos portadores asintomáticos en generaciones anteriores o posteriores al caso índice.

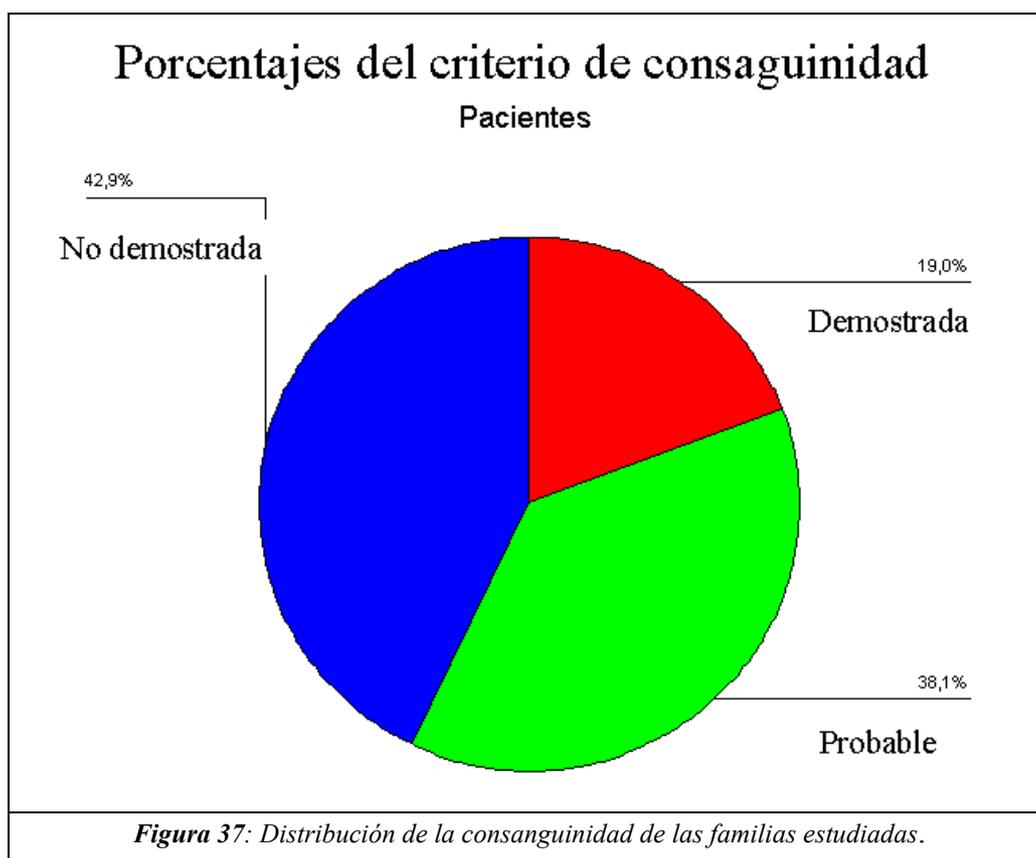


4.3.- RESULTADOS DE LA CARACTERIZACION CLÍNICA DE LA SERIE POR FAMILIAS

4.3.1.- CONSANGUINIDAD DE LAS FAMILIAS.

La entrevista permitió identificar consanguinidad en 4 pedigrís (19,0 %). En otras 7 familias, los progenitores procedían de la misma población, generalmente pequeños

municipios con censos comprendidos entre 84 y 4208 habitantes (<http://www.ine.censo.es>) (Figura 37)



En otra de las familias, las poblaciones de origen (municipios con menos de 6.000 habitantes) estaban muy próximas entre sí. Así, el porcentaje de familias con probable consanguinidad era del 38,1 %.

En el resto de familias (42,9 %) no fue posible demostrar una posible consanguinidad.

4.3.2 ORIGEN GEOGRÁFICO DE LAS FAMILIAS

La procedencia geográfica de los progenitores de los pacientes era muy amplia, como corresponde a una región industrial que fue destino de muchas familias en la sexta y séptima décadas del siglo pasado. Obtuvimos la siguiente distribución por provincias:

ALBACETE	1	LUGO	1
BADAJOS	3	MADRID	1
BALEARES	2	MALAGA	1
BARCELONA	8	ORENSE	2
CORDOBA	4	SALAMANCA	2
CORUÑA	1	SEGOVIA	2
GRANADA	3	SORIA	2
JAEN	2	VALENCIA	1
LEON	2	ZARAGOZA	2
LERIDA	1	IRLANDA	1

Cuando analizamos el censo de las poblaciones de origen de los progenitores, obtuvimos los siguientes resultados:

	A	B	C	D	E	F	G	H	Nº habitantes Población:
A	1								A: < 100
B		3							B: 101-1.000
C		3	2						C: 1.001-3.000
D			1	1					D: 3.001-5.000
E					2				E: 5.001-10.000
F			2			2			F: 10.001-100.000
G		1							G: 100.001-500.000
H							3		H: > 500.000

4.2.3 FAMILIAS CON PATRÓN PSEUDODOMINANTE

En seis familias (PGYM 3, 7, 11, 12, 14 y 15), el patrón era pseudodominante por la presencia de individuos portadores asintomáticos en generaciones anteriores o posteriores al caso índice. Nueve de los familiares referían intolerancia al ejercicio y mialgias. Uno de ellos presentaba contracturas durante el ejercicio isquémico. Ninguno presentaba aumento de las CK o mioglobulinuria. Las mutaciones implicadas con este patrón pseudodominante fueron:

- R49X en estado homocigoto en dos familias
- Y573X/K608K en una familia
- R49X/W797X en una familia
- G204S/N684Y en una familia, y
- R49X/mutación pendiente de identificar (no R49X, no W797R, no G204S), en otra.

4.4.- RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

4.4.1.- MUTACIONES IDENTIFICADAS

Identificamos diez mutaciones diferentes en los 35 pacientes. De ellas, tres ya habían sido descritas (R49X, G204S y W797R). Se detectaron un total de siete nuevas mutaciones: 5 *missense* (L115P, N684Y, R489W, R95W y A669V), una *nonsense* Y573X y una *splice-junction* K698K.

El defecto molecular responsable fue reconocido en 62 alelos. Los estudios moleculares, aún en marcha, han permitido descartar en los pacientes pendientes de caracterizar molecularmente que la mutación responsable sea R49X, G204S ó W797R.

RESULTADOS

La mutación nonsense R49X estaba presente en 30 alelos (42,85%), W797R en 14 (20%), G204S en 7 (10%), L115P en 2 (2,85%), K608K en 2 (2,85%), Y573X en 2 (2,85%), R489W en 2 (2,85%), N684Y en 1 (1,42%), A669V en 1 (1,42%) y R95W en 1 (1,42%). Quedan 8 alelos (11,42%) pendientes de identificar (no R49X, no G204S, no W797R) la mutación responsable

Del total de la serie, en 16 pacientes (45,71%) la mutación fue detectada en estado homocigoto: R49X en 10 pacientes, G204S en 3, W797R en 2 y L115P en uno.

En los pacientes heterocigotos compuestos, la combinación más frecuente fue R49X/W797R en 8 casos (22,85%). En la siguiente tabla se detallan la distribución de las mutaciones, clasificadas por alelos y sexo (*Tabla 3*):

N° PACIENTES	SEXO (H/M)	GENOTIPO	
		ALELO 1	ALELO
10	2/8	R49X	R49X
3	3/0	G204S	G204S
2	1/1	W797R	W797R
1	1/0	L115P	L115P
8	5/3	R49X	W797R
1	1/0	R49X	R93W
2	2/0	W797W	R489W
1	1/0	G204S	N684Y
2	1/1	Y573X	K608K
1	1/0	A669V	¿?
1	1/0	R49X	¿?
3	1/2	¿?	¿?

Tabla 3. Distribución de las mutaciones, clasificadas por alelos y sexo por individuos

4.4.2. DISTRIBUCION DE LAS MUTACIONES POR FAMILIAS

Observamos la siguiente distribución de frecuencias de mutaciones por familias (Tabla 4):

N° FAMILIAS	SEXO (H/M)	GENOTIPO	
		ALELO 1	ALELO 2
7	2/8	R49X	R49X
1	3/0	G204S	G204S
2	1/1	W797R	W797R
1	1/0	L115P	L115P
2	5/3	R49X	W797R
1	1/0	R49X	R93W
1	2/0	W797W	R489W
1	1/0	G204S	N684Y
1	1/1	Y573X	K608K
1	1/0	A669V	¿?
1	1/0	R49X	¿?
2	1/2	¿?	¿?

Tabla 4. distribución de las mutaciones, clasificadas por familias, alelos y sexo.

Del total de las 21 familias que constituye la serie, 7 (33,33%) eran homocigotas para R49X, 2 (9,52%) para la W797R y 2 (9,52%) eran heterocigotas compuestas para R49X/W797R.

4. 5.- CORRELACIÓN CLÍNICO-GENÉTICA EN LA SERIE

No obtuvimos resultados estadísticos que sugirieran una posible asociación de un determinado tipo de mutación con las variables clínicas estudiadas. Tanto el sexo ($p = 0,742$), la edad de inicio ($p = 0,998$), edad en el momento del diagnóstico ($p = 0,784$),

RESULTADOS

retraso en el diagnóstico ($p = 0,932$), la forma clínica ($p = 0,034$), los episodios de mioglobinuria ($p = 0,046$), presencia de debilidad y/o atrofia muscular, de dolor torácico ($p = 0,169$), de taquicardia durante el ejercicio ($p = 0,018$), tiempo de *second wind* ($p = 0,661$), resistencia en el test del ejercicio isquémico ($p = 0,033$), consanguinidad ($p = 0,15$) y pseudodominancia ($p = 0,318$).

Asimismo tampoco existía asociación con los parámetros de laboratorio estudiados:

	CK	CK máxima	AST	ALT	Ácido úrico
Chi-cuadrado Pearson	2,974	2,040	2,140	2,574	0.045
Sig. Asintónica(bilateral) p	0,396	0,564	0,544	0,462	0,998

Tampoco existía una mutación claramente predictiva en las seis familias con un patrón pseudodominante. Observamos las siguientes genotipos en estas familias:

- R49X en estado homocigoto en dos familias,
- Y573X/K608K en una familia
- R49X/W797X en una familia,
- G204/N684Y en una familia, y
- R49X/mutación pendiente de identificar (no R49X, no W797R, no G204S), en otra.