

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS-
MOLECULARES DE LAS INTOLERANCIAS AL
EJERCICIO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR Miguel Ángel Martín Casanueva**

Bajo la dirección del Doctor:
José María Culebras Pozas
Joaquín Arenas Barbero

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2013-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICO-
MOLECULARES DE LAS INTOLERANCIAS AL
EJERCICIO

TESIS DOCTORAL

MIGUEL ÁNGEL MARTÍN CASANUEVA

Madrid, 2.001



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICO-
MOLECULARES DE LAS INTOLERANCIAS AL
EJERCICIO**

MEMORIA PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR DE:

D. MIGUEL ÁNGEL MARTÍN CASANUEVA

Directores:

Prof. Dr. José María Culebras Poza

Prof. Dr. Joaquín Arenas Barbero

Madrid, Julio de 2.001

PROF. DR. D. JOSE MARÍA CULEBRAS POZA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, y

PROF. DR. D. JOAQUÍN ARENAS BARBERO, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y FACULTATIVO ADJUNTO DEL SERVICIO DE BIOQUÍMICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCE DE OCTUBRE DE MADRID:

HACEN CONSTAR QUE:

D. MIGUEL ÁNGEL MARTÍN CASANUEVA ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: **“ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICO-MOLECULARES DE LAS INTOLERANCIAS AL EJERCICIO”**.

Y que dicho estudio reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido para optar al GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA.

*Prof. Dr. Jose María Culebras Poza
Profesor Titular del Departamento de
Bioquímica y Biología Molecular.*

*Prof. Dr. Joaquín Arenas Barbero
Profesor Asociado del Departamento de
Medicina y Facultativo Adjunto de
Bioquímica*

Madrid, Julio de 2.001

"Lo que nos
sostiene en la
inquietud y en el
esfuerzo de
escribir es la
certeza de que en
la página queda
algo que no ha sido
dicho".

Cesare

Pavese

***A mi mujer María José
y a mi hija Nuria***

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi infinita gratitud a mis compañeros del laboratorio del Dr. Arenas del Centro de Investigación del Hospital 12 de Octubre, por su estímulo, siempre necesario para llevar a buen término este trabajo: a Cristina que se marchó pero dejó el recuerdo de su simpatía y su buen hacer, a Yolanda por compartir sus conocimientos moleculares, a Pilar del Hoyo por su amistad y su apoyo constante, a Fernando por su “buen rollo” y sus fructíferas discusiones bioquímicas, a Alberto García por sus cuestiones técnicas, a Sara por sus ayuditas incondicionales, a Alberto Blázquez por su trabajo preciso, a Pilar Jara por su gracia andalusí, y en especial a Juan Carlos con el que he trabajado codo con codo durante los últimos años compartiendo las penas y glorias de este estudio, sin olvidar a los Residentes que han pasado por el laboratorio y colaboraron conmigo.

Mi agradecimiento a las personas que trabajan en el Centro de Investigación, empezando por el jefe de la Unidad, el Dr. Enriquez de Salamanca: a mis queridas “vecinitas” del laboratorio del Dr. Solís, un lugar dónde siempre encuentras sonrisas y palabras amables, además de cualquier reactivo insólito, Paz, Inma, Tere y Elena; a los sabios del laboratorio del Dr. de Pablos, siempre dispuestos a echarme una mano, Bego, María y Maite; a los maestros del fondo a la derecha, Irene, Antonio, M^a José, Susana, Laura, Leticia y Jaime; a los últimos fichajes, el Dr. Rodríguez, y el Dr. Manzanares y sus secuaces; a la “Super” Miluchi, a Mar y a Montse por ayudarme siempre que se lo he pedido; al “secre” Guillermo por sus disquisiciones históricas; al figura de Pedro por sus emocionantes comentarios futbolísticos matutinos; y a los que coincidieron conmigo durante estos años y ya no están: Inma, José Antonio, Belén, “los microbiólogos” y Miguel Rivero y sus surtiditos catalanes.

Me gustaría agradecer profundamente la colaboración de los neurólogos y neuropatólogos que han trabajado en la clasificación de los pacientes y de manera particular a la Dra. Ana Cabello de la Sección de Neuropatología del Hospital 12 de Octubre por su ayuda desinteresada y su cordialidad.

Quiero mencionar a toda la gente del Servicio de Bioquímica del Hospital 12 de Octubre dónde comencé mi experiencia profesional, en especial a la Dra. Pilar Gómez y al Dr. Adolfo Gozalo que siempre han estado a mi lado durante mi formación hospitalaria, a los “Super” Julio y Paco, y a mis compañeros de residencia Teresa, Cristina, José Antonio, Eduardo y Paco, con los cuales he pasado momentos insuperables.

A la Dra. Belén Bornstein con la realicé la primera determinación de CPT muscular, al Dr. Pedro González por su amabilidad y aliento para finalizar la tesis, al Dr. Enrique Díaz por enseñarme a utilizar Internet, al Dr. Toni Andréu por sus consejos sobre genética molecular, a nuestros colegas del Dpto. de Bioquímica de la Fac. de Medicina de la UAM, y a mis amigos de la Facultad de Farmacia Luis Carlos, Jaime y Eduardo.

Es un orgullo agradecer a mis dos familias que estuvieran a mi lado cuando las he necesitado y que me ofrecieran la estabilidad emocional necesaria para poder llegar hasta aquí.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias por la concesión de los proyectos de investigación y las becas FIS 95/0658, FIS 98/1465 y FIS 98/0258.

Al Laboratorio Farmacéutico SIGMA-TAU España cuyo apoyo financiero ha sido fundamental para mi familia y en consecuencia, para realizar esta tesis.

Finalmente, dar las gracias al Dr. Arenas por generar esta idea y creer en mi para llevarla a cabo, y al Prof. Culebras que siempre estuvo dispuesto a ayudarme.

INDICE

	página
INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Recursos metabólicos del músculo esquelético durante el ejercicio. Disfunciones metabólicas asociadas.</i>	2
1.1. Adenosín trifosfato: obtención y utilización.	2
1.2. Utilización de glúcidos y lípidos durante el ejercicio.	4
1.3. Alteraciones metabólicas que se manifiestan como intolerancias al ejercicio.	5
2. <i>Deficiencia de glucógeno fosforilasa muscular. Glucogenosis tipo V. Enfermedad de McArdle.</i>	6
2.1. Características y función bioquímica de la glucógeno fosforilasa muscular.	6
2.2. Expresión clínica.	10
2.3. Características histológicas del músculo.	11
2.4. Laboratorio.	12
2.5. Fisiopatología.	13
2.6. Transmisión genética.	14
2.7. Genética molecular.	14
3. <i>Deficiencia de fosfofructoquinasa muscular. Glucogenosis tipo VII. Enfermedad de Tarui.</i>	17
3.1. Características y función bioquímica de la fosfofructoquinasa muscular.	17
3.2. Expresión clínica.	18
3.3. Características histológicas musculares.	19
3.4. Laboratorio.	20
3.5. Fisiopatología.	20
3.6. Transmisión genética.	22
3.7. Genética molecular.	22
4. <i>Deficiencia de mioadenilato desaminasa.</i>	24
4.1. Características y función bioquímica de la mioadenilato desaminasa.	24
4.2. Expresión clínica.	25
4.3. Histología muscular.	26
4.4. Laboratorio.	27
4.5. Fisiopatología.	27
4.6. Transmisión genética.	28
4.7. Genética molecular.	28
5. <i>Deficiencia de carnitina-palmitil transferasa muscular.</i>	30
5.1. Características y función bioquímica de la carnitina-palmitil transferasa muscular.	30
5.2. Expresión clínica.	35
5.3. Características histológicas del músculo.	37
5.4. Laboratorio.	37
5.5. Fisiopatología.	37
5.6. Transmisión genética.	38
5.7. Genética molecular.	39
OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. <i>Sujetos.</i>	46
1.1. Controles.	46
1.2. Pacientes.	46
2. <i>Muestras.</i>	48
2.1. Determinaciones bioquímicas.	48
2.2. Extracción de ADN.	49
3. <i>Actividad enzimática muscular de miofosforilasa.</i>	51
3.1. Fundamento.	51
3.2. Descripción.	51
4. <i>Actividad enzimática muscular de fosfofructoquinasa.</i>	52
4.1. Fundamento.	52
4.2. Descripción.	52
5. <i>Actividad enzimática muscular de carnitina-palmitil transferasa.</i>	54
5.1. Método de intercambio isotópico.	54
5.2. Método "forward".	56
5.3. Determinación de proteínas no colágenas en homogenado muscular.	57
6. <i>Cribado mutacional en el gen PYGM.</i>	57
6.1. Mutación R49X.	58
6.2. Mutación G204S.	59

7. Análisis de restricción de la mutación R39P en el gen PFKM.	60
8. Análisis de restricción de la mutación Q12X en el gen AMPD1.	60
9. Cribado de mutaciones en el gen CPT2.	62
9.1. Mutación S113L.	62
9.2. Mutación P50H.	63
9.3. Mutaciones Y628S y R631C.	64
10. Caracterización de mutaciones mediante secuenciación directa del gen PYGM.	65
10.1. Etapa de amplificación.	66
10.2. Etapa de purificación.	66
10.3. Etapa de secuenciación.	66
10.4. Etapa de análisis.	67
11. Caracterización de mutaciones mediante secuenciación directa del gen CPT2.	68
12. Evaluación de la potencial patogenicidad de nuevas mutaciones en los genes PYGM y CPT2.	70
13. Análisis bioestadístico.	71
RESULTADOS.	72
1. Deficiencia de miofosforilasa.	73
1.1. Análisis bioquímico.	73
1.2. Caracterización genético-molecular.	74
2. Deficiencia de fosfofructoquinasa muscular.	98
2.1. Análisis bioquímico.	98
2.2. Caracterización genético-molecular.	99
3. Deficiencia de mioadenilato desaminasa.	101
4. Deficiencia de carnitina-palmitil transferasa.	103
4.1. Análisis bioquímico.	103
4.2. Caracterización genético-molecular.	105
DISCUSIÓN.	116
1. Deficiencia de miofosforilasa.	117
2. Deficiencia de fosfofructoquinasa muscular.	123
3. Deficiencia de mioadenilato desaminasa.	124
4. Deficiencia de carnitina-palmitil transferasa.	126
CONCLUSIONES.	131
BIBLIOGRAFÍA.	134
APÉNDICE.	153

ACC: acetil coenzima A carboxilasa	LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber
ACS: acil coenzima A sintetasa	MADA: mioadenilato desaminasa
ADN: ácido desoxirribonucleico	M-CPT I: isoenzima tipo muscular de la carnitina-palmitil transferasa I
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario	MELAS: encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios <i>stroke-like</i>
ADP: adenosín difosfato	MERRF: epilepsia mioclónica y fibras rojo rasgadas
AGCL: ácidos grasos de cadena larga	MILS: síndrome de Leigh de herencia materna
AGL: ácidos grasos libres	min.: minuto/s
AK: adenilato quinasa	MPL: miofosforilasa
AMP: adenosín monofosfato	NAD: nicotín adenín dinucleótido
AMPc: adenosín monofosfato cíclico	NADP: nicotín adenín dinucleótido fosfato
AMPD: adenosín monofosfato desaminasa	NCP: proteínas no colágenas
<i>AMPD1</i> : gen que codifica la mioadenilato desaminasa	OMIM: <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> .
ARN: ácido ribonucleico	PAS: tinción con ácido peryódico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	pb: pares de bases
ARNt: ácido ribonucleico de transferencia	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
ATP: adenosín trifosfato	PEO: oftalmoplejía externa progresiva
BSA: albúmina bovina sérica	PFK: fosfofructoquinasa
CATR: carnitina acilcarnitina translocasa	<i>PFKM</i> : gen que codifica la fosfofructoquinasa muscular
CK: creatín quinasa	Pi: fosfato inorgánico
CoA: coenzima A	PIRA: análisis de restricción con cebador modificado
CPT: carnitina-palmitil transferasa	PPi: pirofosfato
<i>CPT2</i> : gen que codifica la carnitina-palmitil transferasa II	<i>PYGM</i> : gen que codifica la miofosforilasa
DHAP: dihidroxiacetona fosfato	RFLP: fragmentos de restricción de longitud polimórfica
DMSO: dimetilsulfóxido	RMN-P ³¹ : resonancia magnética nuclear de fosforo 31
dNTP: desoxinucleótidos trifosfato	SDS: dodecilsulfato de sodio
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético	UTR: regiones no traducidas
GAP: gliceraldehído-3-fosfato	VO ₂ : captación de oxígeno
GTP: guanidín trifosfato	
HM: homocigoto	
HT: heterocigoto	
HTC: heterocigoto compuesto	
IMP: inosín monofosfato	
Kb: kilobases	
KDa: kilodalton	
L-CPT I: isoenzima tipo hepático de la carnitina-palmitil transferasa I	

INTRODUCCIÓN

1. Recursos metabólicos del músculo esquelético durante el ejercicio. Disfunciones metabólicas asociadas.

1.1. Adenosín trifosfato: obtención y utilización.

Las miofibrillas musculares están compuestas por haces de proteínas contráctiles que constituyen los elementos generadores de fuerza en cada fibra muscular. La contracción muscular se produce mediante asociaciones cíclicas entre la cabeza flexible del filamento grueso de la miosina y los filamentos de actina. Dicha interacción se encuentra regulada por cambios conformacionales dependientes de calcio que ocurren en la troponina unida a actina y en la tropomiosina. Cada ciclo reversible de las interacciones miosina-actina se asocia a la hidrólisis de una molécula de adenosín trifosfato (ATP) en adenosín difosfato (ADP) y fósforo inorgánico (Pi). El ATP es la fuente inmediata de energía para la contracción muscular. Debido a que los depósitos de ATP muscular son escasos, cuando los requerimientos energéticos del músculo aumentan, situación que ocurre durante el ejercicio, éste tiene que ser sintetizado de nuevo a partir de ADP (1). Para ello la célula muscular puede poner en marcha alguno de los siguientes procesos metabólicos (Fig. 1):

1. *Fosforilación oxidativa mitocondrial*, utilizando como sustratos el glucógeno almacenado en el músculo, la glucosa sanguínea y los ácidos grasos libres (AGL) del plasma.
2. *Glucólisis anaeróbica*, que conduce a la producción de lactato.
3. *Activación de la creatín quinasa (CK)*: esta enzima cataliza la formación de ATP a partir de la reserva muscular de fosfocreatina, un compuesto con enlace de alta energía.
4. *Reacción de la adenilato quinasa (AK)*, una enzima que lleva a cabo la conversión de dos moléculas de ADP en una molécula de ATP y una molécula de adenosín monofosfato (AMP). Esta reacción se encuentra acoplada a la catalizada por la *mioadenilato desaminasa (MADA)*, que convierte el AMP formado en inosín monofosfato (IMP).

En los primeros momentos tras el comienzo del ejercicio físico, el ATP puede regenerarse a partir de las reservas de fosfocreatina y ADP por acción de la CK. La AK es una fuente adicional de regeneración de ATP. El AMP formado en la reacción de la AK es desaminado por la MADA con producción de amonio. La MADA al formar parte del ciclo de los nucleótidos de purina produce fumarato, que activa el ciclo de Krebs (2).

Cuando el ejercicio continua, la refosforilación de ADP requiere el consumo de otros sustratos, que son metabolizados a través de distintas rutas bioquímicas. Estos procesos metabólicos son más lentos que la tasa de utilización del ATP durante el ejercicio. Consecuentemente, la disponibilidad de sustratos metabólicos y la velocidad a la que éstos pueden ser metabolizados son los factores más importantes que limitan el ejercicio muscular.

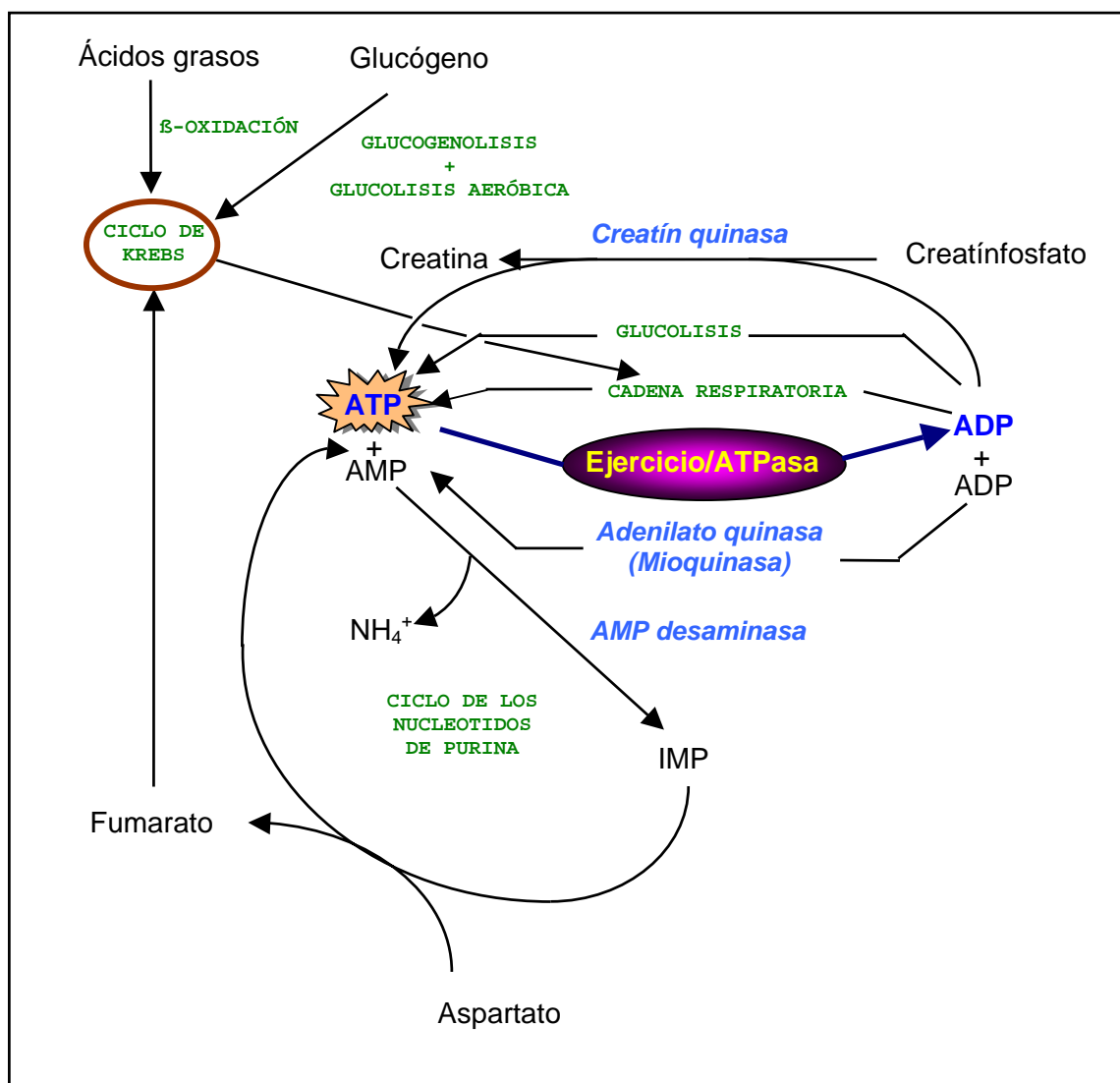


Figura 1. Rutas metabólicas del músculo esquelético implicadas en la degradación y reposición de ATP durante el ejercicio muscular.

ATP, ADP, AMP: adenosín tri, di y monofosfato, respectivamente. IMP: inosín monofosfato.

1.2. Utilización de glúcidos y lípidos durante el ejercicio.

Los músculos humanos utilizan carbohidratos y lípidos como fuentes energéticas (3). El principal glúcido intracelular es el glucógeno que procede de la glucosa sanguínea. Aunque ésta última puede ser utilizada directamente, la mayoría de la glucosa que entra en el músculo es convertida previamente en glucógeno. El principal combustible lipídico son los ácidos grasos libres (AGL) del plasma, con una pequeña contribución de los depósitos de lípidos intracelulares. Los glúcidos pueden metabolizarse de forma aeróbica o anaeróbica, mientras que los lípidos únicamente de forma aeróbica.

1.2.1. *Metabolismo aeróbico y anaeróbico*

La fosforilación oxidativa mitocondrial es la fuente cuantitativa más importante de energía en el ejercicio (la oxidación mitocondrial de una molécula de glucosa procedente del glucógeno proporciona 37 moléculas de ATP mientras que únicamente 3 moléculas son generadas mediante la glucólisis anaeróbica). La glucólisis anaeróbica juega un papel relativamente menor, limitado principalmente a condiciones de contracción isométrica sostenida (cuando la longitud del músculo no se acorta durante la contracción), que es una situación donde el flujo sanguíneo y el aporte de oxígeno a los músculos se encuentra reducido drásticamente. Por otra parte, la glucólisis aeróbica es una fuente importante de energía, especialmente durante la forma más común de ejercicio - el ejercicio dinámico -, tal como andar o correr (1).

La fuente de energía utilizada por el músculo durante el metabolismo aeróbico depende de varios factores (1,4), siendo los más importantes: el tipo, la intensidad y duración del ejercicio, la condición física, y la dieta.

En reposo, el músculo utiliza predominantemente ácidos grasos. Alrededor de un 70% de los requerimientos energéticos en fase de reposo son cubiertos por la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (5,6).

En el otro extremo del espectro, la energía requerida para un ejercicio de gran intensidad intenso, es decir, aquel cercano a la máxima captación de oxígeno ($VO_{2\max}$) en el ejercicio dinámico, o cercano a la máxima generación de fuerza en el ejercicio isométrico, procede de la glucólisis anaeróbica (5,7), en particular cuando ocurre un cambio repentino de actividad con una aceleración rápida hacia el ejercicio máximo (1).

Durante el ejercicio submáximo, el tipo de combustible utilizado depende de la intensidad relativa del ejercicio (1):

- a) A intensidades bajas, por debajo del 50% de la $VO_{2\max}$, la fuente principal de energía es la glucosa sanguínea y los AGL.

- b) A intensidades mas altas aumenta la proporción de energía procedente de la oxidación de los carbohidratos y el glucógeno se convierte en un combustible importante.
- c) A una intensidad relativamente más alta, del 70 al 80% de la VO_2_{max} , el metabolismo aeróbico del glucógeno es una fuente energética crucial, de forma que la fatiga comienza cuando los depósitos de glucógeno se han agotado (8).

Durante el *ejercicio moderado*, que corresponde al ejercicio submáximo con tasas entre un 40%-60% de la VO_2_{max} , el sustrato metabolizado varía con la duración del ejercicio, de forma que se produce un aumento gradual en la utilización de AGL respecto a la utilización de glucosa, hasta que en el transcurso de pocas horas, la oxidación de los lípidos se convierte en la fuente principal de energía (9). Cuando esto ocurre, el ejercicio es totalmente aeróbico, y por tanto la acumulación de lactato y piruvato en sangre periférica es mínima; por otra parte, el aumento significativo en la movilización de sustratos lipídicos conduce a un incremento de AGL y glicerol en plasma. En esta situación, también se produce un aumento de β -hidroxibutirato, lo que indica un aumento de oxidación lipídica en el hígado. Debido a que la disponibilidad de AGL procedentes del tejido adiposo es prácticamente ilimitada, una persona normal puede desarrollar un ejercicio dinámico moderado durante varias horas (1).

Además de la duración y la intensidad del ejercicio, los siguientes factores también afectan a la proporción relativa de glucosa y AGL que son utilizados (6): la concentración sanguínea de AGL, el flujo sanguíneo muscular, la concentración de glucógeno muscular, y el estado de ayuno o ingesta (3). Esta última condición es de gran trascendencia, ya que el ayuno prolongado estimula la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo que conducen en el hígado a la biosíntesis de cuerpos cetónicos, los cuales pueden posteriormente ser captados y oxidados por el músculo esquelético.

1.3. Alteraciones metabólicas que se manifiestan como intolerancias al ejercicio.

Las intolerancias al ejercicio se producen como consecuencia de disfunciones en algunas de las enzimas que intervienen en las rutas metabólicas implicadas en la obtención de energía necesaria para la contracción muscular.

Las enzimopatías que cursan con este síntoma como principal característica clínica se pueden clasificar en:

- a) glucogenosis musculares: principalmente déficit de *miofosforilasa* (MPL) (1,10,11) y déficit de *fosfofructoquinasa* (PFK) muscular (1,12). Otras glucogenosis musculares que cursan con intolerancia al ejercicio son deficiencias en ciertas enzimas de la glucólisis distal (déficits de *fosfogliceratoquinasa*, *fosfogliceratomutasa* y *lactato deshidrogenasa*) (1),
- b) alteración del transporte mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga: déficit de *carnitina-palmitil transferasa* (CPT) II en músculo esquelético (13, 14),
- c) alteración del ciclo de los nucleótidos de purina: déficit de *mioadenilato desaminasa* (15,16),
- d) trastornos en los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial que se asocian a intolerancia al ejercicio como síntoma prominente (17).

En esta tesis se abordan los déficits de MPL y PFK dentro de las glucogenosis musculares debido a la mayor prevalencia con respecto a las glucogenosis distales (1, 18). Los déficits de CPT II y de MADA constituyen las enzimopatías asociadas a intolerancia al ejercicio más frecuentes en el metabolismo de los ácidos grasos (6) y en el ciclo de los nucleótidos de purina (2). Las disfunciones metabólicas de la cadena respiratoria que cursan con intolerancia al ejercicio no se tratan en esta tesis al considerar que éstas deben enfocarse tanto desde el punto de vista bioquímico como genético en el entorno de las denominadas citopatías mitocondriales (19, 20).

2. Deficiencia de glucógeno fosforilasa muscular. Glucogenosis tipo V. Enfermedad de McArdle.

2.1. Características y función bioquímica de la glucógeno fosforilasa muscular.

En humanos se han identificado tres isoenzimas de la glucógeno fosforilasa ó 1,4- α -D-glucan:ortofosfato- α -D-glucosil-transferasa (EC 2.4.1.1): hepática (L), muscular (M) o miofosforilasa y cerebral (B) (21). La isoenzima M es la única de las tres que se expresa en el músculo esquelético maduro, representa el 50 % de la actividad fosforilasa en el miocardio y alrededor de un 20-30% en cerebro (22,23). En cultivos de miocitos y en fibras musculares regenerativas de pacientes con deficiencia de MPL, se ha demostrado la existencia de actividad fosforilasa debida a la presencia de una isoenzima denominada "fetal" (24,25) que se expresa en los estados iniciales de la miogénesis.

El glucógeno es un homopolisacárido ramificado de reserva formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces del tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$. Éstos últimos están localizados en los puntos de ramificación que se encuentran situados cada 8 a 12 residuos de glucosa. En humanos, el glucógeno se encuentra almacenado principalmente en hígado y músculo. El músculo contiene alrededor de 14 g de glucógeno por Kg de tejido. Este valor no varía apenas con el ayuno o una dieta rica en carbohidratos, aunque llega a ser cien veces inferior después de realizar un ejercicio prolongado. El glucógeno muscular, al contrario que el hepático, constituye una reserva energética para la contracción muscular y únicamente puede ser metabolizado por la fibra muscular debido a la ausencia de *glucosa-6-fosfatasa*, la enzima necesaria para liberar glucosa (26).

La miofosforilasa, que representa alrededor del 5% de la proteína soluble muscular, se encarga de la degradación del glucógeno eliminando las cadenas periféricas de la molécula de glucógeno. Su actividad enzimática conduce a la ruptura de los enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y conlleva la captación de fósforo inorgánico con liberación de glucosa-1-fosfato (1) (Fig. 2). La constante de equilibrio de la reacción es de 0,3. En el músculo es alrededor de cien veces inferior como consecuencia de la baja concentración de glucosa-1-fosfato, al ser convertida ésta en glucosa-6-fosfato mediante la acción de la *fosfoglucomutasa*, cuya reacción se encuentra desplazada en un 95% hacia la formación de glucosa-6-fosfato. En consecuencia la MPL actúa únicamente en la dirección de degradación de glucógeno muscular (26).

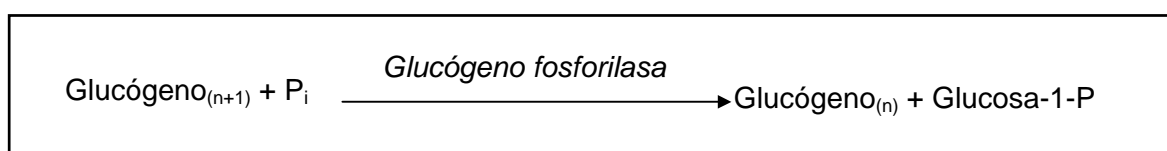


Figura 2. Catálisis enzimática de la glucógeno fosforilasa.

La MPL va degradando las cadenas periféricas del glucógeno hasta que su tamaño es de cuatro restos glucosilos en relación a un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$. El polisacárido degradado parcialmente resultante de la acción de la MPL se denomina dextrina límite. La eliminación de las ramificaciones se efectúa mediante la enzima *desramificante* o *amilo-1-6-glucosidasa*. La acción conjunta de esta enzima y la MPL permite que el polímero sea degradado hasta glucosa-1-fosfato mayoritariamente ($\approx 93\%$) y alguna molécula de glucosa ($\approx 7\%$) (1).

La MPL en su forma activa o *fosforilasa a*, es un dímero (M_2) formado por dos subunidades idénticas constituidas cada una de ellas por 841 aminoácidos con un peso molecular de 97 KDa (23). El centro activo contiene piridoxal fosfato. Es una enzima alostérica compleja sujeta a control positivo y negativo, de forma que ligandos intracelulares como AMP y glucógeno, activan la enzima favoreciendo la formación del conformero R activo, mientras que glucosa, glucosa-6-P y nucleósidos de purina inhiben la actividad estabilizando el conformero T inactivo (3,27,28). Cada monómero puede ser fosforilado covalentemente en el residuo serina-14, lo que convierte la *fosforilasa b*, que es la forma inactiva y homotetramérica de la MPL en la forma a, activa. La activación de la fosforilasa es catalizada por la *fosforilasa b quinasa*, cuya isoenzima muscular está formada por cuatro subunidades distintas ($\alpha\beta\gamma\delta$)₄, siendo la subunidad γ la calmodulina (26). La unión de cuatro iones calcio a la calmodulina produce la activación de la *fosforilasa b quinasa*. Esta enzima es a su vez regulada por la *proteínquinasa dependiente de AMP cíclico* (Fig. 3).

Basándose en la estructura tridimensional de la proteína y en la posiciones de los residuos implicados en el centro activo y en los centros reguladores, se ha dividido al monómero en dos dominios: el dominio N-terminal (aa 1-482) o dominio “regulador”, que contiene la mayoría de los residuos de unión a ligandos, y la mayor parte de los residuos que entran en contacto con residuos del otro monómero (residuos de contacto entre dímeros), que son esenciales para transmitir los cambios conformacionales entre las subunidades tras la unión de un efector; y el dominio C-terminal (aa 483-841) o dominio “catalítico” que contiene la mayoría de los residuos del centro activo y los implicados en la unión al piridoxal fosfato (28).

El AMP es el principal modulador alostérico de la MPL y puede activar la forma inactiva b hasta un 80% de su actividad máxima. Esta activación es antagonizada por glucosa, glucosa-6-fosfato y ATP. Por otra parte, la fosforilación de la MPL produce una pérdida de la regulación AMP/ATP, pero no ocurre del mismo modo con la regulación por glucosa, aunque esta situación es de mayor relevancia en el hígado que en el músculo (26). Además, el AMP, que es un indicador muy sensible de la disminución del nivel energético celular, activa tanto a la fosforilasa b como la ruta glucolítica mediante la activación alostérica de la PFK; por tanto, su efecto final es aumentar la disponibilidad de glucosa procedente de la degradación del glucógeno para su entrada en la vía glucolítica.

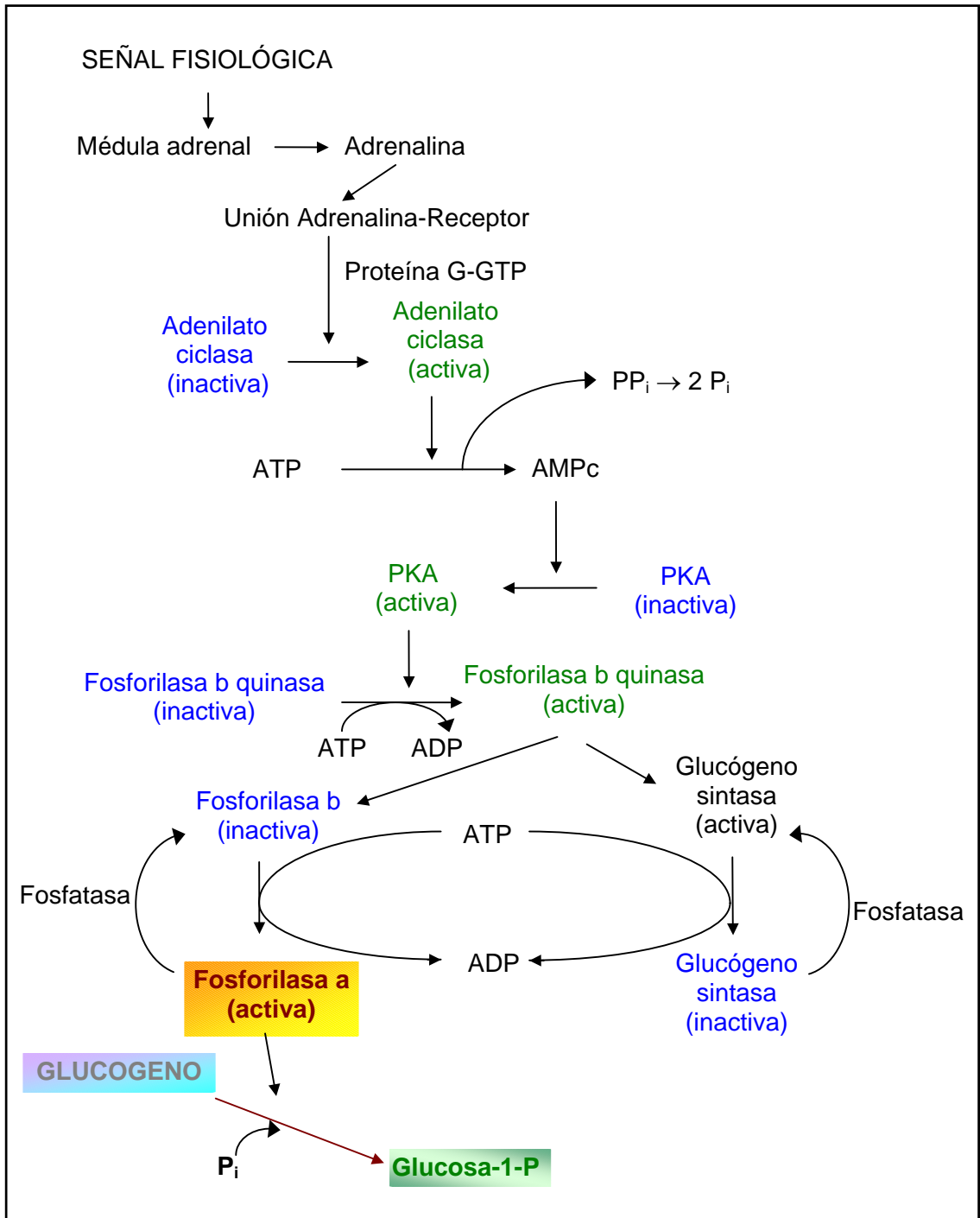


Figura 3. Mecanismo celular de activación de la degradación del glucógeno

GTP: guanósil trifosfato, ATP y ADP: adenósil tri y difosfato, respectivamente, AMPc: adenósil monofosfato cíclico, PP_i: pirofosfato, P_i: fosfato inorgánico, PKA: proteínaquinasa dependiente de AMPc.

2.2. Expresión clínica

En 1951, Brian McArdle (10) describió por primera vez la enfermedad (OMIM: 232600). La alteración enzimática que causaba la enfermedad se descubrió en 1959 (29,30). El cuadro clínico más frecuente en pacientes con déficit de MPL se caracteriza por los siguientes hallazgos.

2.2.1. Intolerancia al ejercicio.

Se manifiesta con mialgia, fatiga prematura y rigidez o debilidad de los músculos utilizados, síntomas que disminuyen con el reposo (1,31). El tipo de ejercicio que precipita estos síntomas varía según los pacientes, pero en general se debe a dos formas (1): ejercicio breve de alta intensidad - contracción isométrica -, tal como empujar un coche parado, llevar grandes pesos, esprintar, y ejercicio algo menos intenso pero de mayor duración - aeróbico -, como subir por un monte, andar sobre arena, nadar, subir escaleras, montar en bicicleta. El ejercicio moderado, tal como andar sobre una calle sin desnivel, puede llevarse a cabo sin problemas por la mayoría de los pacientes.

Una importante característica de esta enfermedad es el fenómeno de “segunda entrada” o “second wind” (32), es decir, si el paciente descansa brevemente cuando comienza la mialgia y la rigidez -fase de adaptación-, éste puede continuar el ejercicio durante más tiempo -fase de segunda entrada- (31).

2.2.2. Mioglobinuria.

Si el paciente excede los límites de ejercicio que le permite esta enfermedad, sufrirá calambres dolorosos que pueden llegar a producir mioglobinuria y necrosis muscular si el ejercicio es extenuante o prolongado (31,33). Los episodios de mioglobinuria no complicados se siguen de una completa recuperación. Si las crisis son graves los pacientes pueden desarrollar fracaso renal (en torno a la mitad de los pacientes que presentan mioglobinuria (1)). Ya que la mioglobinuria siempre es consecuencia del ejercicio y generalmente viene precedida de calambres o mialgias como señales de alarma, el número de ataques (alrededor de un 50% de los pacientes presentan mioglobinuria (1)) tiende a ser menor que en los pacientes con deficiencia de CPT muscular (33).

2.2.3. Inicio de los síntomas, edad de diagnóstico y sexo.

El comienzo de los primeros síntomas se produce normalmente en la infancia, si bien el diagnóstico habitualmente se realiza en la segunda o tercera década de la vida debido a que los calambres y la mioglobinuria raramente se producen antes de los 10 años de edad. El diagnóstico después de los 50 años es raro (1). Alrededor de dos tercios de los casos descritos han correspondido a varones.

2.2.4. Variabilidad clínica.

En unos cuantos pacientes la presentación clínica está dominada por la debilidad muscular permanente que afecta a los músculos proximales más que a los distales. La pérdida muscular es rara y solamente se ha observado en pacientes mayores (34,35).

También se han descrito casos muy graves con déficit de MPL de presentación neonatal (36-38).

Debido a que no existen problemas neurológicos en la mayoría de los pacientes jóvenes, sus quejas se consideran a menudo como “psicológicas” o mal intencionadas (evitar realizar el servicio militar, no realizar ejercicios gimnásticos en el colegio, etc.) (39). Tras la obligación a realizar ejercicio en este tipo de lugares, los pacientes pueden desembocar en una crisis de mioglobinuria severa.

2.3. Características histológicas del músculo.

2.3.1. Microscopía óptica y electrónica

- Tinción de glucógeno. Ácido peryódico de Schiff (PAS). Pueden aparecer depósitos subsarcolemales de glucógeno en la periferia de las fibras, aunque no se observan en todos los pacientes (39).
- Existen fibras degenerativas y regenerativas en buena parte de las biopsias (40).
- La microscopía electrónica revela de forma más o menos abundante acúmulos subsarcolemales de partículas β de glucógeno de apariencia normal (39).

2.3.2. Histoquímica.

Existe una reacción histoquímica para fosforilasa muscular descrita por Takeuchi y Kuriaki (41), que se fundamenta en la elongación de las cadenas periféricas del glucógeno endógeno en presencia de glucosa-1-fosfato.

En la mayoría de los pacientes no se produce tinción en la fibra muscular, sin embargo la tinción es normal en el músculo liso vascular.

Una tinción positiva que daría lugar a resultados equívocos puede producirse en alguno de los siguientes casos:

- a) Cuando existe actividad enzimática residual que sea superior a un 3-10% (34,42).
- b) Cuando se encuentran fibras regenerativas: la reacción histoquímica se produce porque este tipo de fibras musculares inmaduras expresa una isoenzima distinta a la isoenzima de fosforilasa del músculo maduro (24, 25), aunque en estos casos la tinción positiva para MPL suele observarse en fibras que se encuentran dispersadas entre otras fibras con ausencia de tinción. Esta situación es más probable cuando la biopsia se practica demasiado pronto tras un episodio de mioglobinuria, cuando la regeneración es muy activa (43).

2.4. Laboratorio

2.4.1. Determinación de creatín quinasa en suero.

El aumento de la CK sérica es un marcador de rabdomiolisis. Además de su elevación tras un episodio de mioglobinuria, esta enzima se encuentra elevada de forma persistente en la mayoría de los pacientes. Esta característica es un hallazgo diferencial respecto al déficit de CPT, dónde la CK en periodos intercríticos se encuentra habitualmente dentro del intervalo de valores normales (1,44).

2.4.2. Prueba funcional de ejercicio en isquemia en el antebrazo.

Fue introducida por McArdle (10) y se fundamenta en que cualquier bloqueo metabólico a lo largo de la vía glucogenolítica o glucolítica puede impedir la producción de lactato durante la realización de ejercicio en condiciones de isquemia (39).

Previa toma de una muestra de sangre en condiciones basales, la prueba consiste en situar un esfigmomanómetro en el antebrazo del paciente inflándolo por encima de la presión arterial; después el paciente comienza a apretar con su mano una esponja u otro utensilio para que la aguja marque el máximo. Después de un minuto de ejercicio se desinfla y se obtienen muestras sanguíneas a los minutos 1, 3, 5 y 10.

En individuos normales se produce un incremento de las concentraciones de lactato en suero de 3 a 5 veces respecto a las basales en las primeras dos muestras, y luego disminuye hasta el valor basal. En los pacientes con enfermedad de McArdle no se produce aumento de lactato venoso -curva plana-. Es una prueba funcional de gran ayuda diagnóstica, aunque no específica de la enfermedad. Existen factores que pueden afectarla (1), como (i) la capacidad y buena voluntad del paciente para realizar ejercicio

durante el tiempo necesario para estimular la ruta glucogenolítica, (ii) la variabilidad preanalítica de la determinación de lactato sérico: se requieren tubos de extracción especiales con inhibidores de la glucólisis eritrocitaria y una separación rápida del plasma.

2.5. Fisiopatología

Existen dos mecanismos fisiopatológicos que son la causa fundamental de la intolerancia al ejercicio en esta enfermedad: (i) el bloqueo de la glucólisis anaeróbica priva al músculo de la energía necesaria durante el ejercicio isométrico, y (ii) la incapacidad para utilizar aeróbicamente el glucógeno, con la correspondiente disminución de piruvato y acetil-CoA, impide el ejercicio dinámico por encima de una cierta intensidad (alrededor del 50% de $VO_{2\text{ max}}$) (45).

El fenómeno de “segunda entrada” parece depender de dos factores: una mayor movilización y utilización de ácidos grasos de cadena larga y un aumento del flujo sanguíneo en los músculos utilizados durante el ejercicio (32). Además, se puede producir un aumento de la concentración de alanina por transaminación del piruvato. En el hígado mediante gluconeogénesis se sintetizaría glucosa que tras ser liberada al torrente circulatorio sería utilizada por el músculo como sustrato energético - ciclo alanina-glucosa -(46).

La fatiga prematura aparece posiblemente como resultado de un fallo de la excitación muscular y podría ser causada por un acúmulo excesivo de ADP (47). Los mecanismos que parecen estar implicados son (48): inhibición de la disociación de ADP de la miosina, interacción del ADP con los filamentos delgados incrementando su sensibilidad al calcio, y alteración de la función del retículo sarcoplasmático produciendo un aumento de la concentración sarcoplasmática de calcio. En un trabajo reciente Haller y cols. (49) han demostrado que los niveles de las bombas de Na^+K^+ -ATPasa musculares se encuentran disminuidos respecto a individuos sedentarios sanos, y que como consecuencia de ello se produce un aumento del potasio extracelular. Este hecho probablemente contribuya al desarrollo de fatiga debido a un fallo en la excitación de la membrana sarcoplasmática cuando ocurren tasas altas de estimulación muscular. Además, dicho aumento de potasio extracelular podría contribuir a las exageradas respuestas cardiopulmonares que suelen producirse en los pacientes con déficit de MPL.

Las causas de la contractura y la mioglobinuria son desconocidas. La depleción de compuestos de fosfato de alta energía, especialmente ATP, se considera un acontecimiento crucial, pero las medidas bioquímicas o de espectroscopía de RMN- P^{31}

(50) no han podido demostrar una depleción de ATP en la fatiga prematura o durante contracturas inducidas durante el ejercicio isquémico.

2.6. Transmisión genética

A pesar del predominio de varones afectados, la enfermedad de McArdle se transmite de forma autosómica recesiva. Algunos autores han descrito transmisión autosómica dominante (51) en algunas familias. Hay dos posibles mecanismos que podrían explicar esta herencia pseudodominante: (i) existencia de pacientes heterocigotos en los que la actividad MPL se encuentra entre el 20% y el 50% de la actividad normal pero son sintomáticos (52), (ii) presencia de pacientes homocigotos o heterocigotos compuestos (individuos que contienen dos mutaciones distintas en cada alelo del gen de MPL), en dos generaciones sucesivas que se han producido por casualidad o a causa de mutaciones frecuentes (53).

2.7. Genética molecular

2.7.1. Características del gen *PYGM*

Se conocen tres isoenzimas humanas de la glucógeno fosforilasa: muscular, hepática y cerebral, codificadas por tres genes distintos asignados a los cromosomas 11q13 (54,55), 14 (56) y 10,20 (57), respectivamente. El gen humano que codifica para la MPL ha sido clonado y secuenciado (58) y se denomina *PYGM*. El gen posee 20 exones que codifican una media de 41 ± 15 aminoácidos. Los intrones tienen un tamaño que varía desde 83 pb del intrón 3 a las 2.400 del 5. La región codificante tiene un tamaño de 2.523 pb.

2.7.2. ARN mensajero.

El ARNm transcrito por *PYGM* tiene un tamaño de 3,4 Kb (59). Estudios de Northern-blot han demostrado que la enfermedad de McArdle es genéticamente heterogénea (59-61), de forma que en la biopsia muscular de 21 pacientes, el ARNm estaba ausente en 12, disminuido en 4 y era de menor tamaño en uno.

Tabla I. Mutaciones en el gen *PYGM* asociadas con la enfermedad de McArdle.

Ref.	Codon Localización	Alteración nucleotídica	Efecto deducido	Comentario
62	0	ATG → CTG	Met → Leu	Rara
63	0	ATG → GTG	Met → Val	Rara
64	15	G → TT	Desplazamiento de lectura y proteína truncada	Rara
53,65	49	CGA → TGA	Arg → Stop	Común en pacientes americanos y europeos
66	115	CTG → CCG	Leu → Pro	Rara
53	204	GGC → AGC	Gly → Ser	Varias familias
67	291	CTG → CCG	Leu → Pro	Rara
68	361	TGG → TAG	Trp → Stop	Rara
69	396	CTG → CCG	Leu → Pro	Rara
70	510	G → delección	Desplazamiento de lectura y proteína truncada	Rara
71	540	GAA → TAA	Glu → Stop	Rara
53	542	AAG → ACG	Lys → Thr	Rara
63	575	CGA → TGA	Arg → Stop	Rara
67	Extremo 5' intrón 14	g → a	Delección de 67 pb en el ARNm, desplazamiento de lectura.	Varias familias
69	654	GAG → AAG	Glu → Lys	Rara
63	665	CAG → GAG	Gln → Glu	Rara
72	684	AAC → TAC	Asn → Tyr	Rara
63	685	GGG → AGG	Gly → Arg	Rara
67	708/709	TTC → delección	Phe → delección	Común en pacientes japoneses
73	753	A → delección	Desplazamiento de lectura y proteína truncada.	Rara

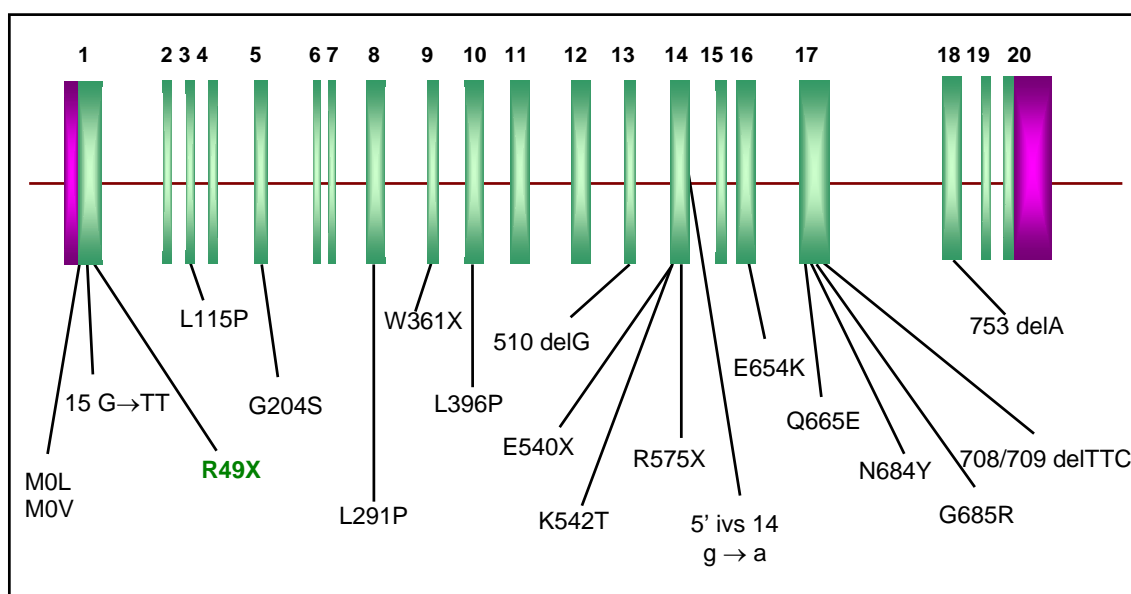


Figura 4. Localización de las mutaciones descritas en el gen PYGM.

Los rectángulos representan a los exones. Las zonas rosas indican las regiones no traducibles. La mutación más frecuente en pacientes con déficit de miofosforilasa en color verde. ivs: intrón; del: delección.

2.7.2. Mutaciones

Lebo y cols. (55) en un estudio de búsqueda de RFLP que sirvieran como marcadores de individuos con riesgo, no encontraron grandes delecciones en el gen *PYGM* en los pacientes con enfermedad de McArdle. Si se han encontrado recientemente microdelecciones de un nucleótido o de un triplete, así como microinserciones (Tabla I).

Mediante análisis de secuenciación del gen *PYGM* se ha confirmado la existencia de una gran heterogeneidad genética en estos pacientes, que ya era sospechada en los análisis de Northern. Se han identificado varias mutaciones puntuales (Tabla I). En la figura 4 se muestra la localización de las mutaciones en el gen *PYGM* asociadas con déficit de miofosforilasa.

2.7.3.1. Mutación R49X.

Es una mutación "sin sentido". Es la mutación más frecuente en poblaciones de origen caucásico (53,65). Tsujino y cols. (53) estudiaron 40 pacientes con enfermedad de McArdle, 38 presentaban déficit bioquímico de miofosforilasa y 2 eran familiares sintomáticos. 33 pacientes presentaban los síntomas habituales de la enfermedad. La mutación R49X se encontró en homocigosis en 18 pacientes, y en un sólo alelo en 12 pacientes, de forma que el 75 % de los pacientes presentaban dicha mutación en alguno de sus alelos. 6 pacientes resultaron heterocigotos compuestos. En este estudio con tres

mutaciones se lograba detectar al 90% de los pacientes con déficit de miofosforilasa mediante análisis genético.

La mutación R49X implica la traducción de una proteína de tamaño muy reducido. El hecho de que esta mutación genere un codón de terminación en el exón 1 podría estar relacionado con la ausencia de una proteína enzimática estable en músculo en la mayoría de los pacientes (60). La ausencia de ARNm en la mitad de los pacientes (59-61) también podría ser consecuencia de esta mutación debido a que ésta, en el trabajo de Tsujino y cols. (53), estaba presente en una proporción similar de pacientes.

La mutación R49X ha sido estudiada en otros pacientes por el mismo grupo de Tsujino (74), de manera que combinando ambas series de pacientes - 72 sujetos - encontraron una frecuencia alélica para R49X del 64%. Por otra parte, el análisis mutacional de R49X en poblaciones europeas, ha arrojado frecuencias alélicas del 81%, 56% y 32% en pacientes de origen británico - 16 pacientes estudiados - (65), alemán - 9 pacientes- (63) y mediterráneo, italianos - 14 pacientes- (75) y españoles - 19 pacientes - (76), respectivamente. Estos resultados han sugerido la posible existencia de un gradiente decreciente Norte-Sur de esta mutación en Europa.

2.6.3.2. Mutación G204S

Es una mutación “de sentido equivocado” que constituye la segunda más frecuente en pacientes de origen anglosajón y se ha encontrado únicamente en heterocigosis. Este residuo aminoacídico se encuentra involucrado en un dominio de la proteína implicado en la unión al glucógeno y en la tetramerización de la enzima (53).

3. Deficiencia de fosfofructoquinasa muscular. Glucogenosis tipo VII. Enfermedad de Tarui.

3.1. Características y función bioquímica de la fosfofructoquinasa muscular.

La enzima fosfofructoquinasa (PFK), también denominada ATP:D-fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa o fosfofructoquinasa 1 (EC. 2.7.1.11) cataliza el paso limitante de la vía glucolítica. Es un tetrámero formado por la combinación de tres subunidades denominadas muscular (M), hepática (L) y plaquetar (P), cada una con un peso molecular aproximado de 85 KDa (77). El músculo maduro únicamente expresa la subunidad M, por tanto, contiene exclusivamente el homotetramero M_4 . Por el contrario, los eritrocitos expresan tanto la subunidad L como la M, dando lugar a 5 isoenzimas, dos

homotetrámeros (L_4 y M_4) y tres híbridos L_xM_x (31). Otros tejidos, como el hígado y el riñón expresan sólo las subunidades L y P. El monómero M contiene 780 aminoácidos y predomina en el corazón y en el cerebro (78). Tanto el músculo inmaduro como el músculo no inervado expresan las tres subunidades, representando la isoenzima M_4 un 15 -20% de la actividad total de PFK (79).

La PFK utiliza el ion Mg^{2+} como cofactor y cataliza el paso de la glucólisis que da lugar a la formación de fructosa-1,6-difosfato a partir de la fructosa-6-fosfato y consumo de una molécula de ATP (Fig. 5). Es una reacción endoenergónica ($\Delta G = -4.0$ Kcal/mol) y prácticamente irreversible (80).

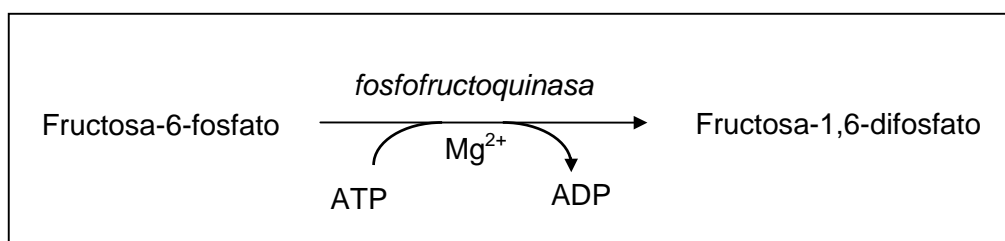


Figura 5. Reacción glucolítica catalizada por la fosfofructoquinasa.

La PFK es una enzima alostérica y su actividad se halla regulada por un gran número de efectores negativos como ATP, citrato, Ca^{2+} , fosfoenolpiruvato, 1,3-difosfoglicerato y palmitato, y de moduladores positivos como fructosa-2,6-difosfato, AMP, ADP y fructosa-1,6-difosfato (80).

La reacción en dirección a fructosa-6-fosfato la cataliza una enzima distinta (80), la *fructosa 1,6-difosfatasa* que forma parte de la ruta gluconeogénica, una ruta metabólica que se encuentra confinada al hígado y a la corteza renal en mamíferos.

3.2. Expresión clínica

La deficiencia de PFK (OMIM 232800) fue descrita por primera vez en 1965 por Tarui y cols. (81) en varios miembros de una familia japonesa y en 1967 por Layzer y cols. (82) en un paciente americano.

3.2.1. Cuadro clínico habitual.

La presentación clínica típica de la deficiencia de PFK muscular es indistinguible de la enfermedad de McArdle, por tanto el diagnóstico diferencial precisa de la demostración del defecto enzimático (31,83) .

Produce intolerancia al ejercicio, especialmente si éste es de tipo isométrico o ejercicio aeróbico intenso (1,31). Los episodios de mioglobinuria parece que se producen en una menor proporción de pacientes que en el déficit de miofosforilasa, y el fracaso renal se ha descrito en un solo caso (83). El fenómeno de “segunda entrada” se manifiesta en algunos pacientes, pero no en todos (31). La intolerancia al ejercicio es evidente desde la infancia, aunque el diagnóstico se establece generalmente en la adolescencia o en adultos jóvenes (1).

3.2.2. Otras características.

Se han descrito algunos casos con presencia de ictericia debido a que en este déficit enzimático los eritrocitos tienen alterada la subunidad M, con lo cual se produce hemólisis con aumento de reticulocitos en sangre (84), y otros casos con hiperuricemia miogénica (85), que en ciertos pacientes se manifiesta como artritis gotosa.

La variabilidad clínica es frecuente (31). Existen individuos que presentan debilidad fija, sobre todo cuando los síntomas comienzan en la edad madura. Se han descrito casos de presentación infantil con síntomas más graves. En otros pacientes la enfermedad cursa con anemia hemolítica sin rasgos miopáticos.

3.3. Características histológicas musculares

3.3.1. Microscopía óptica y electrónica

La tinción de glucógeno (PAS) puede demostrar depósitos semejantes a los descritos en la glucogenosis V. Una diferencia destacable es que en algunas ocasiones, especialmente en pacientes mayores (31), se comprueba la presencia de material glucídico anormal en un 2-10% de las fibras. Este material es positivo para PAS y no se digiere cuando se aplica diastasa salival (83).

En microscopía electrónica se encuentran de forma mas o menos abundante acúmulos subsarcolemales de partículas de glucógeno de apariencia normal, y además pueden aparecer polisacáridos anormales con formas granulares y filamentosas (31).

3.3.2. Histoquímica.

Existe una reacción para fosfofructoquinasa muscular (86), que permite demostrar histoquímicamente el defecto enzimático.

3.4. Laboratorio

La concentración sérica de CK es variable pero se halla elevada de forma persistente en los pacientes con la presentación clínica habitual. En la prueba de ejercicio en isquemia no se produce un aumento de lactato venoso. La presencia en sangre de una reticulocitosis moderada y una concentración elevada de bilirrubina sérica reflejaría la alteración hematológica debida al déficit de PFK-M eritrocitaria. Las concentraciones séricas de ácido úrico se encuentran elevadas en la mayoría de los pacientes (31).

3.5. Fisiopatología

3.5.1. Fenómeno "Out of Wind"

Los mecanismos fisiopatológicos de la intolerancia al ejercicio son los mismos que los que ocurren en la enfermedad de McArdle (31). Esta semejanza fisiopatológica entre los dos déficits enzimáticos refuerza el concepto de que la utilización del glucógeno es más importante que la utilización de glucosa durante el ejercicio aeróbico máximo (87). La diferencia más destacable es la incapacidad por parte del músculo deficiente en PFK para utilizar glucosa. Por ello, en dicho déficit el músculo depende de la disponibilidad de ácidos grasos durante la captación máxima de oxígeno. Este fenómeno se ha estudiado (87) induciendo en cuatro pacientes grandes variaciones en los niveles de AGL plasmáticos mediante la administración intravenosa de glucosa, el ayuno nocturno y la infusión intravenosa de triglicéridos y heparina, observándose que aumentaba la $VO_{2\text{ max}}$ y la extracción de O_2 por el tejido muscular cuando aumentaba la disponibilidad de AGL. También se dedujo que la intolerancia al ejercicio empeoraba tras la ingesta de dietas ricas en glúcidos, debido a que la glucosa induce una disminución de AGL y cuerpos cetónicos en sangre, que son sustratos alternativos utilizados durante el "second wind". Esta característica se ha denominado "out of wind" (Fig. 6).

3.5.2. Fatiga prematura, calambres y mioglobinuria

La patogénesis de la fatiga prematura, los calambres y la mioglobinuria aún no se conoce. Se ha postulado un papel causal de la fatiga prematura para el ADP, tras observar que se acumulaba ADP tanto en pacientes con déficit de PFK muscular como con déficit de miofosforilasa, y que únicamente se acumulaba fósforo inorgánico en estos últimos y no en los primeros (88,89).

3.5.3. Hiperuricemia miogénica

La hiperuricemia, que también se manifiesta en algunos pacientes con enfermedad de McArdle, se atribuye a una degradación excesiva de nucleótidos de purina (85). La elevación de la concentración sanguínea de inosina e hipoxantina es seguido de un incremento de la concentración de ácido úrico mediada por el hígado: hiperuricemia miogénica (85,88). La administración de glucosa en estos pacientes, además de su efecto antilipolítico, produce un aumento adicional de las concentraciones plasmáticas de amonio e hipoxantina, agravando su hiperuricemia (88).

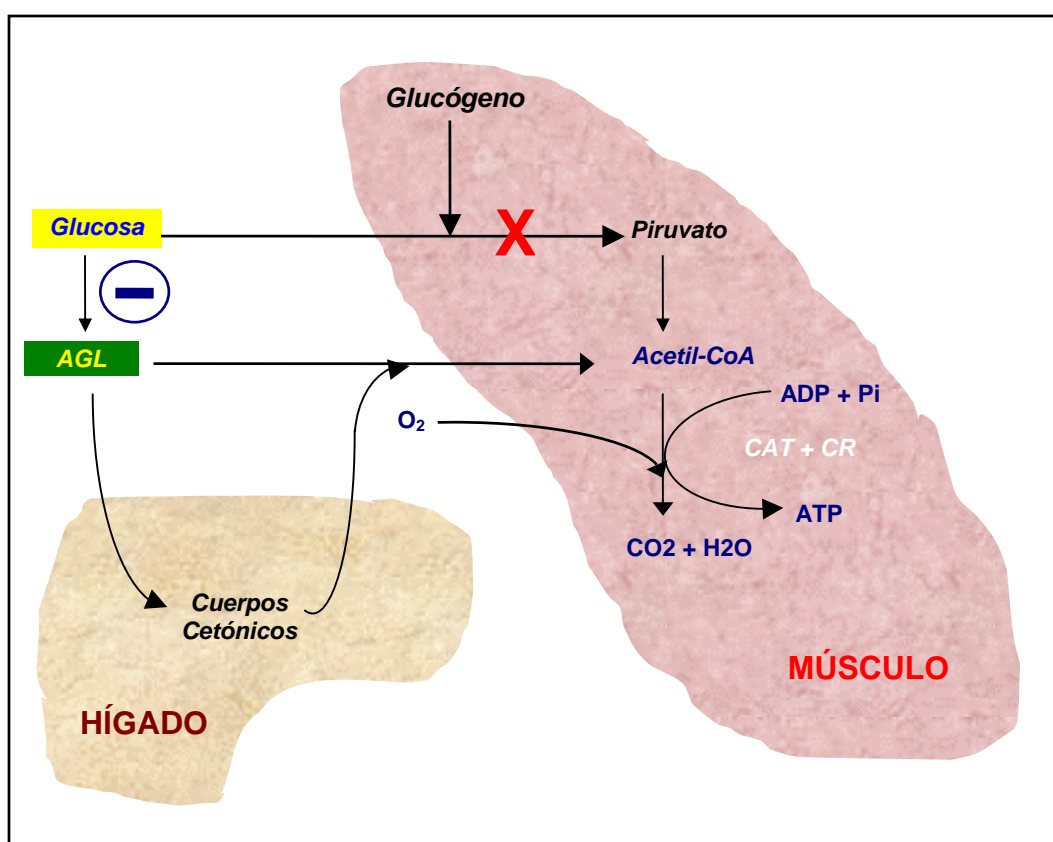


Figura 6. Mecanismo "Out of wind" inducido por glucosa en pacientes con deficiencia de fosfofructoquinasa muscular.

X indica el lugar del bloqueo metabólico en el músculo esquelético debido a déficit de PFK. El aumento de glucosa plasmática induce una disminución de las concentraciones plasmáticas de AGL, lo que conlleva una disminución su disponibilidad muscular, así como la de los cuerpos cetónicos. CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. CR: cadena respiratoria mitocondrial.

3.6. Transmisión genética

La enfermedad de Tarui se hereda de manera autosómica recesiva, aunque predominan los varones afectados (83). La pseudodominancia propuesta en una familia en la cual se manifestó la enfermedad en dos generaciones podría explicarse por la presencia de heterocigosis compuesta en dos generaciones sucesivas (90).

3.7. Genética molecular

3.7.1. Características del gen *PFKM*

Los genes que codifican las subunidades M, L y P de la PFK han sido localizados en los cromosomas 11cen→q32 (91), 21q22.3 (92) y 10p (93) respectivamente. Recientemente se ha reasignado el gen de la subunidad M, denominado *PFKM*, al cromosoma 12q13 (94). Este gen ha sido clonado (95) y secuenciado (96), y contiene 24 exones.

3.7.2. *ARNm*

Se han identificado 3 tipos de ARN mensajeros denominados A, B y C. Los transcritos A y B comparten el mismo promotor, que parece ser específico del tejido muscular, y se diferencian por “splicing alternativo”. Los dos comienzan la transcripción en el exón 2, reteniéndose en el tipo B la secuencia del intrón 2. La transcripción del tipo C depende de un segundo promotor que es funcional en una gran variedad de tejidos, comenzando la transcripción en el exón 1, y cuyo mecanismo de “splicing” une el exón 1 con el 4, evitando la transcripción de los exones 2 y 3 (96,97).

Si cerebro y corazón expresaran subunidades M diferentes se podría explicar por qué dichos órganos no están afectados clínicamente en la deficiencia de PFK, a pesar del alto porcentaje de expresión de subunidades M en los mismos (31).

3.7.3. *Mutaciones*

Se han descubierto varias mutaciones en los pacientes con déficit de PFK, existiendo una gran variabilidad molecular (98). No existe una mutación prevalente. Una gran parte de los pacientes son de origen judío Ashkenazi (31). Las mutaciones descritas se han observado en un sólo individuo o familia, siendo mutaciones puntuales o microdeleciones (Tabla II). La figura 7 muestra la localización de las mutaciones a lo largo del gen *PFKM*.

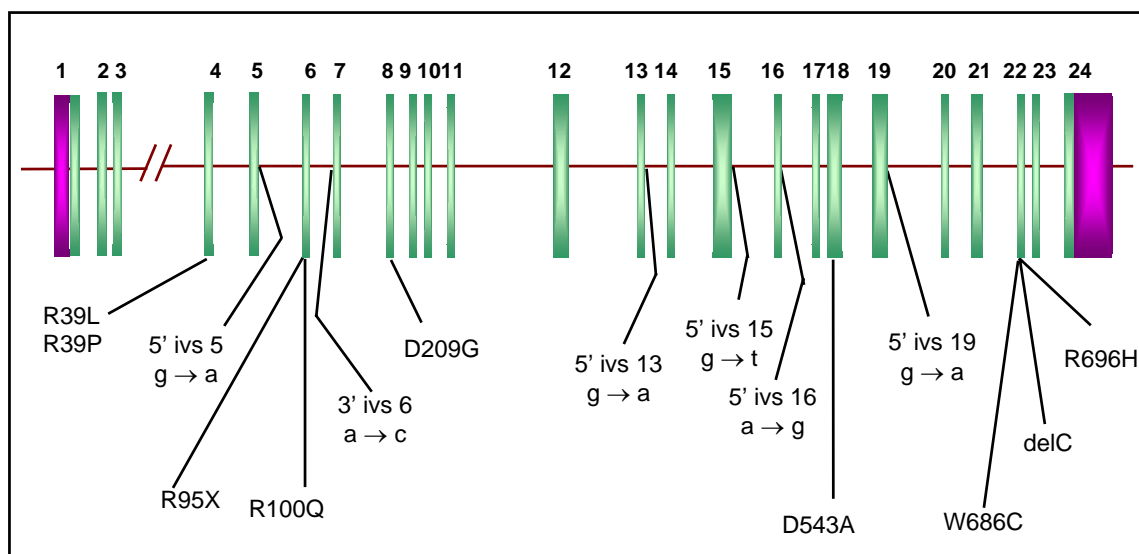


Figura 7. Localización de las mutaciones del gen PFKM asociadas con enfermedad de Tarui
Los rectángulos son los exones. Las zonas coloreadas indican las regiones no traducibles. ivs = intrón; del = delección.

Tabla II. Alteraciones genéticas del gen PFKM asociadas con la enfermedad de Tarui.

Ref.	Codon Localización	Alteración nucleotídica	Efecto deducido	Comentario
99	Extremo 5' del intrón 5	g → a	Delección del exón 5 en el ARNm	Ashkenazi
100	Extremo 3' del intrón 6	a → c	Delección de 12 pb y 15 pb en el ARNm.	Italianos
101	Extremo 5' del intrón 13	g → a	Retención de 155 nt del intrón	Suecos
102	Extremo 5' del intrón 15	g → t	Delección de 75 pb en el ARNm.	Familia descrita por Tarui
101	Extremo 5' del intrón 16	a → g	Retención de 65 nt del intrón	Suecos
103	Extremo 5' del intrón 19	g → a	Delección del exón 19, delección de 165 pb en ARNm	Japoneses
100	39	CGA → CCA	Arg → Pro	Italianos
104	39	CGA → CTA	Arg → Leu	Ashkenazi
105	95	CGA → TGA	Arg → Stop	Ashkenazi
106	100	CGA → CAA	Arg → Gln	Suizo
106	209	GGC → GAC	Asp → Gly	Canadiense francófono
100	543	GAC → GCC	Asp → Ala	Italianos
107	686	TGG → TGT	Trp → Cys	Japoneses
106	696	CGT → CAT	Arg → His	Suizo
104	Exón 22	C → Delección	Desplazamiento de lectura	Ashkenazi

3.7.3.1. Mutación R39P

Esta mutación (100) se ha encontrado en un paciente de origen italiano que presentaba un doble fallo genético, un déficit de PFK asociado a homocigosis de esta mutación y un déficit de MADA asociado a una mutación común (Q12X) también en homocigosis (108).

4. Deficiencia de mioadenilato desaminasa

4.1. Características y función bioquímica de la mioadenilato desaminasa

La mioadenilato desaminasa (MADA) (EC 3.5.4.6) es la isoenzima específica muscular de la enzima AMP desaminasa (AMPD). Otras isoenzimas de la AMPD son la hepática (L) y las eritrocitarias (E1 y E2) (109). Parece existir un isoenzima fetal de MADA según un estudio de maduración de células musculares en cultivo (110).

La MADA es un homotetramero que contiene zinc y cuyas subunidades poseen 747 aminoácidos con un peso molecular de 60 a 70 KDa (16). La MADA forma parte del ciclo de los nucleótidos de purina (Fig. 1) y cataliza la desaminación de 5'-AMP a 5'-inosín monofosfato (5'-IMP) con producción de ion amonio (Fig. 8) (111).

Es una enzima alostérica regulada por diversos efectores como adenina, guanina, fluoruro, fosfatos y polifosfatos, heparina, pH, potasio, poliaminas y alanina (16). Se conocen dos hechos que sugieren que la MADA es un paso limitante en el catabolismo de los nucleótidos de adenina: el 95% de inhibición por GTP en reposo y la resíntesis de AMP en el ciclo de los nucleótidos púricos (112, 113).

El músculo esquelético posee una actividad de MADA diez veces mayor que otros tejidos (114), dato que avala la relevancia de esta enzima en el metabolismo energético muscular, por lo que su función bioquímica hay que encuadrarla en el ámbito del ejercicio muscular. Durante el ejercicio el ATP es degradado a ADP. La enzima *mioquinasa* ó *adenilato quinasa* reconvierte dos moléculas de ADP de nuevo a ATP con formación de AMP (111). Para mantener la carga energética muscular a un nivel elevado (115) y para desplazar la reacción de la mioquinasa hacia la formación de ATP, el AMP formado es eliminado del medio mediante la reacción catalizada por la MADA (Fig. 8). Su función fisiológica debe situarse, probablemente, en el momento en el cuál el aporte local de oxígeno sea insuficiente para mantener la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial (16).

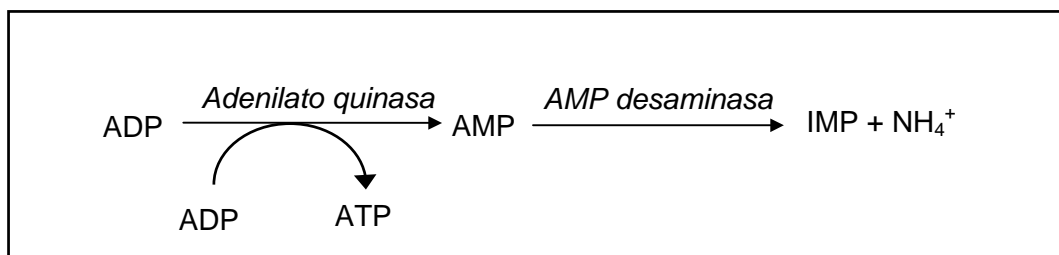


Figura 8. Acoplamiento entre las reacciones catalizadas por AK y MADA.

La MADA, como parte integrante del ciclo de los nucleótidos de purina, interviene en la biosíntesis de fumarato a partir del aminoácido aspartato, alimentando de sustratos al ciclo de Krebs, y por tanto, contribuyendo a la regeneración de ATP (11). Se han descrito otras posibles funciones para este ciclo metabólico (114): regulación de los niveles relativos de nucleótidos púricos, desaminación de aminoácidos, regulación de la ruta glucolítica mediante la formación de amonio y AMP, debido a que el AMP es un activador tanto de la MPL como de la PFK y a que el amonio formado podría tamponar la acidez del lactato acumulado.

4.2. Expresión clínica

El déficit enzimático de MADA (OMIM 102770) fue descrito por primera vez en 1978 por Fishbein y cols. (15) en pacientes con síntomas musculares inducidos por el ejercicio.

4.2.1. Cuadro clínico

La forma clínica habitual de la deficiencia de MADA consiste en una miopatía metabólica que incluye síntomas relacionados con intolerancia al ejercicio tales como fatiga prematura, dolor muscular y/o calambres (16, 111). Alrededor del 90% de los casos citados en la literatura presentan estas características (116), sin embargo, no representan a todos los pacientes.

4.2.2. Comienzo de los síntomas

La edad de inicio de los síntomas es variable. Puede decirse que éstos pueden comenzar en la infancia, en la adolescencia, en jóvenes adultos y en la cuarta-quinta década de la vida, repartiéndose cada grupo el 25% de los casos (116).

4.2.3. Variabilidad clínica

No todos los estudios han encontrado correlación entre los síntomas inducidos por el ejercicio y la deficiencia de MADA, sino que existe una gran variabilidad clínica (117). Por otra parte, se han observado individuos en algunas familias que siendo asintomáticos no presentaban actividad MADA (111). La diferente expresión sintomática y el amplio rango de la edad de comienzo suscitó dudas sobre el carácter patológico de este déficit (117-120). Parte de esta controversia puede deberse a la alta prevalencia de este déficit. Se ha confirmado la presencia de déficit de MADA en alrededor del 2% de las biopsias musculares que se admiten para examen histológico (116) y además se ha observado déficit de MADA en torno a un 2% de la población sana (121,122). Por otro lado, esta alteración metabólica se ha encontrado asociada a otras deficiencias enzimáticas musculares relacionadas con intolerancia al ejercicio tales como déficit de miofosforilasa (123), déficit de fosfofructoquinasa (108) y deficiencia de CPT muscular (124), lo cual contribuiría a la distinta presentación clínica.

A causa de esta heterogeneidad clínica (125,126), se considera que la deficiencia de mioadenilato desaminasa es transmitida de forma autosómica recesiva, exhibiendo penetrancia variable en la expresión fenotípica de mialgia relacionada con el ejercicio. De esta manera, se ha propuesto que pueden ocurrir tres formas clínicas de esta deficiencia (126):

- (i) déficit de MADA congénito sintomático: pacientes con deficiencia histoquímica y/o bioquímica de MADA con mialgia relacionada con el ejercicio en los que no se conocen otras anomalías neurológicas, patológicas o bioquímicas,
- (ii) déficit de MADA adquirido: pacientes con deficiencia histoquímica y/o bioquímica de MADA, que puede ser parcial, y que presentan una enfermedad neuromuscular primaria causante de su fenotipo principal, y
- (iii) déficit de MADA congénito coincidente: pacientes con deficiencia histoquímica y/o bioquímica de MADA en los cuales existe otra enfermedad metabólica concomitante, como p. ej. déficit de miofosforilasa.

4.3. Histología muscular

4.3.1. Microscopía óptica y electrónica

La observación microscópica del tejido muscular suele ser normal o contener cambios mínimos inespecíficos (16).

4.3.2. *Histoquímica.*

La tinción histoenzimática para la adenilato desaminasa basada en el uso de sales de tetrazolio y puesta a punto por Fishbein y cols. en 1981 (127), parece ser un indicador muy fiable y útil en el diagnóstico de déficit de MADA (16); esto último es debido a que los métodos de determinación de la actividad enzimática en tejido muscular son poco específicos o muy laboriosos (128).

4.4. Laboratorio

4.4.1. *Determinación de creatín quinasa en suero.*

Alrededor de la mitad de los casos presentan aumentos moderados de esta enzima (16).

4.4.2. *Prueba funcional de ejercicio en isquemia. Relación lactato-amonio.*

Esta prueba fue introducida en la clínica por Fishbein con la primera descripción de la enfermedad (15). Se fundamenta en el hecho de que la producción de amonio muscular durante el ejercicio se encuentra drásticamente disminuida en condiciones de isquemia como consecuencia de la inactividad de la MADA. Se suele determinar simultáneamente la concentración de lactato como indicador del grado de isquemia alcanzado durante la prueba (16).

Algunos autores utilizan la relación entre el aumento de ion amonio y el aumento de lactato en suero durante la prueba (16,129). En los individuos normales el incremento de amonio es superior al 1,5% respecto al aumento de lactato, por el contrario, en los pacientes con déficit de MADA este incremento relativo se sitúa por debajo del 0.4% (16).

4.5. Fisiopatología

Actualmente, las bases metabólicas que causan los síntomas no son del todo comprendidas. En un principio (130) se propuso que el defecto enzimático provocaba un aumento de AMP en los miocitos durante el ejercicio, con la consiguiente desfosforilación de esta molécula a adenosina. Como se conocía que la adenosina puede difundir fácilmente a través de las membranas celulares, era de esperar que los pacientes con deficiencia de MADA tuvieran una depleción de nucleótidos de adenina.

Estudios posteriores han ofrecido resultados contradictorios. Se ha visto que durante el ejercicio, en pacientes con déficit de MADA, las células musculares no pierden más nucleótidos de adenina que las células musculares de controles sanos (131,132). Por otra parte, se ha observado que como consecuencia de los síntomas, los pacientes

tienen que interrumpir el ejercicio antes que los controles, y sin embargo los primeros degradan más creatín-fosfato y más ATP que los últimos. Por tanto, la explicación fisiopatológica más probable de los síntomas es una disminución de la producción de energía que además puede ser, al menos en parte, debida a la falta de síntesis de fumarato durante el ejercicio (111).

4.6. Transmisión genética

El déficit enzimático congénito parece transmitirse de forma autosómica recesiva (133), y muestra penetrancia variable del fenotipo de mialgia relacionada con el ejercicio (126).

4.7. Genética molecular

4.7.1. Características del gen *AMPD1*.

En humanos existen al menos cuatro isoformas de AMP desaminasa: la isoforma M en el músculo esquelético, la isoforma L en el hígado y las isoformas E1 y E2 en los eritrocitos. La isoforma M está codificada por el gen denominado *AMPD1* localizado en el cromosoma 1p21-p23 (134), y las isoformas hepática y eritrocitarias son codificadas por los genes *AMPD2* (135,136) y *AMPD3* (137,138), respectivamente.

El gen *AMPD1* tiene un tamaño aproximado de 20 Kb y contiene 16 exones con un tamaño entre 101 y 220 pb, a excepción del llamado “miniexón” 2 que posee únicamente 12 nucleótidos. El tamaño de los intrones varía de 159 pb del intrón 14 hasta varias kilobases (139).

El gen *AMPD1* se expresa marcadamente en músculo esquelético de rata, mientras que *AMPD2* se expresa predominantemente en tejidos no musculares y en el músculo liso, músculo embrionario y mioblastos indiferenciados. Ambos genes se expresan en el músculo cardíaco (135).

4.7.2. ARNm.

El gen *AMPD1* produce dos tipos de transcritos en el músculo esquelético adulto: un transcrito denominado “normal” y un ARNm “alternativo” que se sintetiza al ser eliminado el miniexón 2 durante el mecanismo de “splicing” (139). Sin embargo, ambos transcritos codifican una proteína funcional. El ARNm “alternativo” parece representar entre el 0,6% y el 2% de todos los transcritos de *AMPD1*, porcentaje aún mayor durante la diferenciación *in vitro* de miocitos humanos.

Analizando el ARNm en 9 pacientes con deficiencia de MADA se midió una cantidad normal de transcrito de *AMPD1* (140).

4.7.3. Mutaciones

Hasta ahora únicamente se ha identificado una alteración molecular asociada a déficit de MADA (141). Dicha alteración es una mutación “sin sentido” (Q12X).

4.7.3.1. Mutación Q12X.

En 1992, Morisaki y cols. (141) analizaron 11 pacientes con deficiencia de MADA que no estaban relacionados entre sí. Todos ellos resultaron ser homocigotos para un mismo alelo mutante caracterizado por dos transiciones C→T, una en la posición nucleotídica 34 en el exón 2 que conlleva el cambio de un residuo de glutamina (CAA) por un triplete de terminación (TAA) en el codon número 12, y otra situada en el nucleótido 143 del exón 3 y produce la sustitución de prolina por leucina el aminoácido 48. La alteración Q12X predice la biosíntesis de una proteína de tamaño muy reducido, presunción que es consistente con la ausencia de proteína inmunorreactiva en el músculo de esos pacientes (141). Por otra parte, en este mismo trabajo se observó el alelo mutante en el 12 % de la población caucasiana y en el 19% de la población de afro-americanos, mientras que no la poseían ninguno de los 106 japoneses estudiados, de lo que se concluyó que dicho alelo era lo suficientemente frecuente como para relacionarse con la ya conocida incidencia del 2% de déficits de MADA en biopsias musculares.

Morisaki y cols. (139) en un trabajo posterior intentan explicar por qué la mutación Q12X puede no causar síntomas en algunos individuos que la presentan en homocigosis, afirmando que la síntesis del ARNm “alternativo” que elimina el exón 2 y que produce una proteína funcional, puede producir lo que llamaron un “rescate fenotípico”.

En un estudio reciente (142) en la población alemana se ha encontrado la misma frecuencia de este alelo mutante tanto en la población general, como en pacientes con síntomas neuromusculares (déficit adquirido), llegando a la conclusión de que la deficiencia de MADA es una variante genética inocua, hecho que ha alimentado la controversia sobre las consecuencias patogénicas del déficit de MADA (143,144).

Con todo ello, en una revisión reciente Sabina (126) propone de nuevo la clasificación fenotípica de la deficiencia de MADA basándose en datos genético-moleculares. Así tendríamos que en un déficit congénito sintomático el paciente debería ser homocigoto para la mutación Q12X o heterocigoto compuesto para mutaciones aún desconocidas. Un déficit adquirido estaría formado por una enfermedad primaria

muscular y el paciente presentaría una mutación en el gen *AMPD1* al menos en uno de sus alelos. Un déficit congénito coincidente estaría representado por un paciente en el que existe homocigosis mutante para *AMPD1* y una alteración metabólica “coincidente” con base genético-molecular demostrada (p. ej. paciente con la mutación Q12X-*AMPD1* en homocigosis junto la mutación R49X-*PYGM* en homocigosis, es lo que se denomina “doble problema genético”).

5. Deficiencia de carnitina-palmitil transferasa muscular

5.1. Características y función bioquímica de la carnitina-palmitil transferasa muscular

La *carnitina-palmitil transferasa* (EC 2.3.1.2) mitocondrial también denominada Palmitil-CoA: L-carnitina O-palmitiltransferasa es un sistema enzimático compuesto por dos enzimas: la CPT I que se encuentra unida a la membrana externa mitocondrial y la CPT II que está localizada en la membrana interna mitocondrial (145,146). Este sistema, junto a la enzima *acil-CoA de cadena larga sintetasa* (ACS) o *tioquinasa* de la membrana externa (147) y a la *carnitina acil-carnitina translocasa* (CATR) de la membrana interna (148), es el encargado de transportar los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) citoplasmáticos hacia la matriz mitocondrial, dónde son oxidados hasta acetil-CoA en el proceso cíclico de la β -oxidación (149). Los ácidos grasos de cadena media y corta pueden ser transportados directamente a través de las membranas mitocondriales sin la intervención de este sistema enzimático.

El cometido de la ACS es la activación de los AGCL, para lo que requiere ATP y coenzima A (CoA). La reacción libera AMP y un enlace pirofosfato, lo cual facilita el desplazamiento de la misma hacia la derecha, haciéndola prácticamente irreversible en el sentido de activación de los AGCL (Fig. 9).

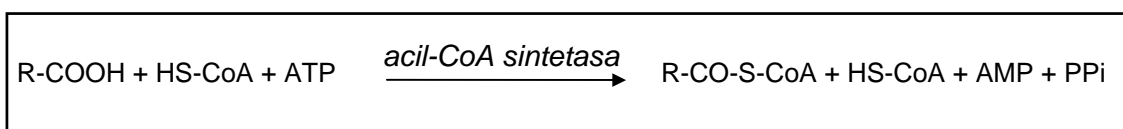


Figura 9. Activación de los ácidos grasos a ésteres de coenzima A por la ACS.

Una vez activados, los AGCL que no son capaces de atravesar la membrana mitocondrial interna (150), son convertidos en ésteres de L-carnitina (acil-carnitina) en la reacción catalizada por la CPT I, liberando CoA en el citosol (151). Las acil-carnitinas atraviesan la membrana interna mitocondrial mediante un proceso de intercambio con L-

carnitina catalizado por la CATR (148,152). En el interior de la mitocondria las acil-carnitinas son reconvertidas a ésteres de CoA (acil-CoA) mediante la acción de la transferasa de la membrana interna, CPT II, con utilización de CoA intramitocondrial y liberación de L-carnitina. La disponibilidad de CoA intramitocondrial en esta reacción y en otras como la del *complejo piruvato deshidrogenasa* y la de la *deshidrogenasa de los ceto-ácidos de cadena ramificada*, se encuentra controlada por la *carnitina-acetil transferasa* (CAT) (153). Esta enzima regula la relación CoA/acetil-CoA intramitocondrial mediante la liberación extramitocondrial de ésteres de carnitina (Fig. 10).

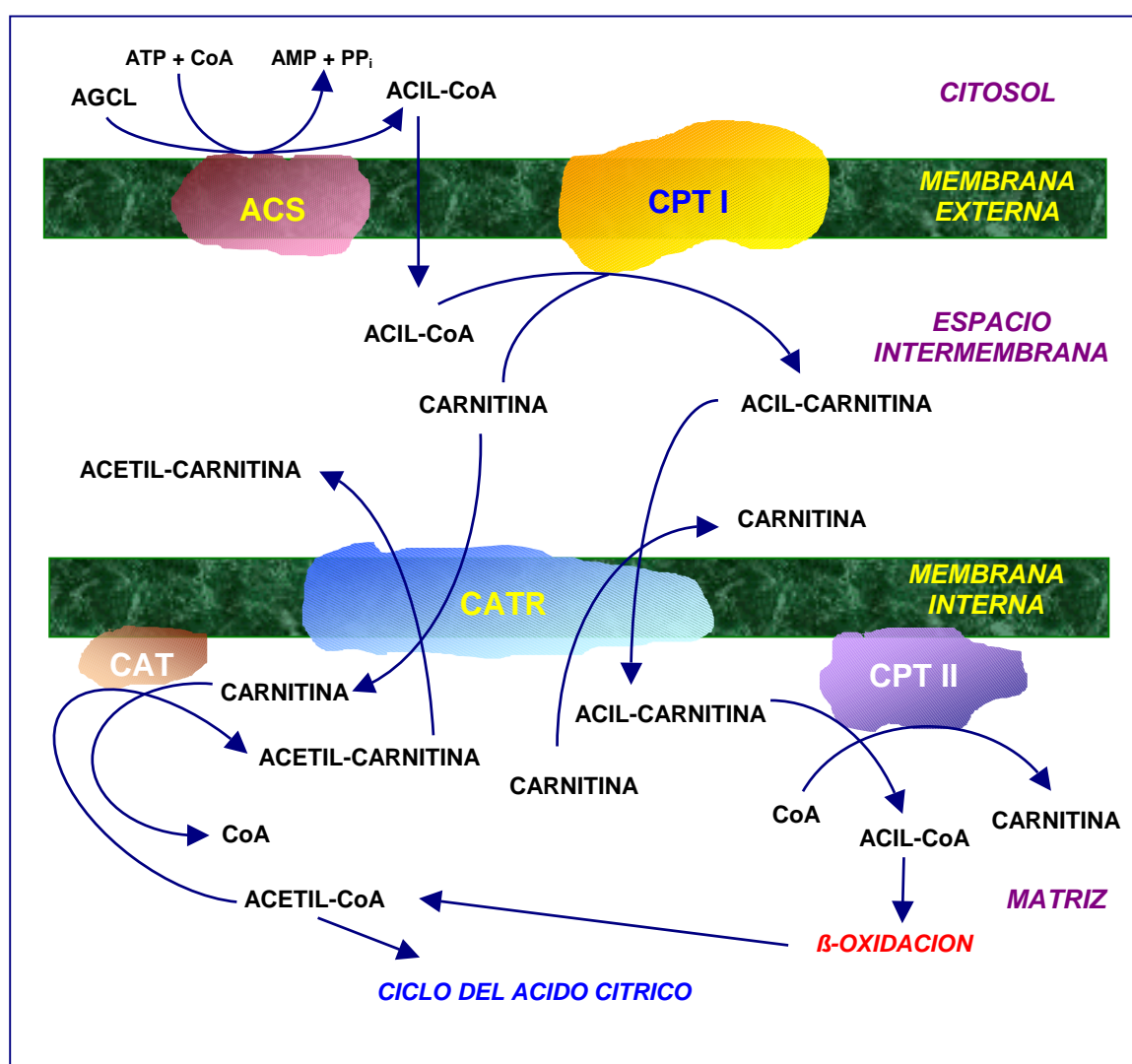


Figura 10. Organización mitocondrial del sistema carnitina-palmitil transferasa.

Las reacciones catalizadas por CPT I, CPT II, CAT y CATR son reversibles y la translocasa es capaz de introducir y exportar carnitina libre y ésteres de carnitina de cadena corta, media y larga a través de la membrana interna mitocondrial. ACS: acilCoA sintetasa; AGCL: ácido graso de cadena larga; CAT: carnitina-acetil transferasa; CATR: carnitina-acilcarnitina translocasa; CPT: carnitina-palmitil transferasa.

La CPT I se encuentra unida fuertemente a la membrana externa y es liberada de ella en forma inactiva cuando se utilizan detergentes fuertes. Esto ha sido una de las causas de su difícil aislamiento y del debate que se ha generado en relación a su localización subcelular. Por el contrario, la CPT II se encuentra débilmente unida a la membrana interna y es liberada en forma activa con el uso de detergentes (154,155).

Otra característica destacable que diferencia a las dos enzimas es la inhibición que ejerce el malonil-CoA sobre la CPT I y no sobre la CPT II (156). La biosíntesis de malonil-CoA se realiza por carboxilación de una molécula de acetil-CoA mediante la acción de la *acetil-CoA carboxilasa* (ACC) y la utilización de ATP, en el primer paso de la ruta biosintética de los ácidos grasos (157). En tejidos como el hígado donde la síntesis y la degradación de ácidos grasos están controladas por la ingesta, el malonil-CoA podría ser el principal regulador de estos procesos. Así, en el ayuno y en otros estados cetóticos se produce una disminución de la relación insulina/glucagón que estimula los procesos catabólicos, lo que conlleva a un incremento de la síntesis de citrato. Éste al ser un inhibidor alostérico de la ACC disminuye la síntesis de malonil-CoA desapareciendo la inhibición sobre CPT I que trae consigo un incremento en la oxidación intramitocondrial de ácidos grasos. Por el contrario, en situaciones de ingesta, el aumento de insulina estimula la lipogénesis, y la ACC biosintetiza malonil-CoA que ejercerá simultáneamente como sustrato lipogénico y como inhibidor de CPT I, logrando que los acil-CoA sintetizados no sean de nuevo reoxidados, sino posteriormente esterificados en triglicéridos para formar parte de las VLDL hepáticas que serán exportadas hasta el tejido adiposo para su almacenamiento (157,158) (Fig. 11). Además del control de la CPT I hepática por malonil-CoA, también parece existir una menor sensibilidad a éste por CPT I en condiciones que favorecen la oxidación y la formación de cuerpos cetónicos (159).

En tejidos no lipogénicos como corazón y músculo esquelético también existe actividad ACC y las concentraciones de malonil-CoA varían con la ingesta, lo cual resulta en cierto modo sorprendente. En el tejido cardíaco la síntesis de malonil-CoA está determinada principalmente por la disponibilidad de acetil-CoA lo que indicaría un papel para el malonil-CoA como inhibidor de la CPT I más que como sustrato lipogénico (160). La función del malonil-CoA en el músculo esquelético es aún desconocida (157).

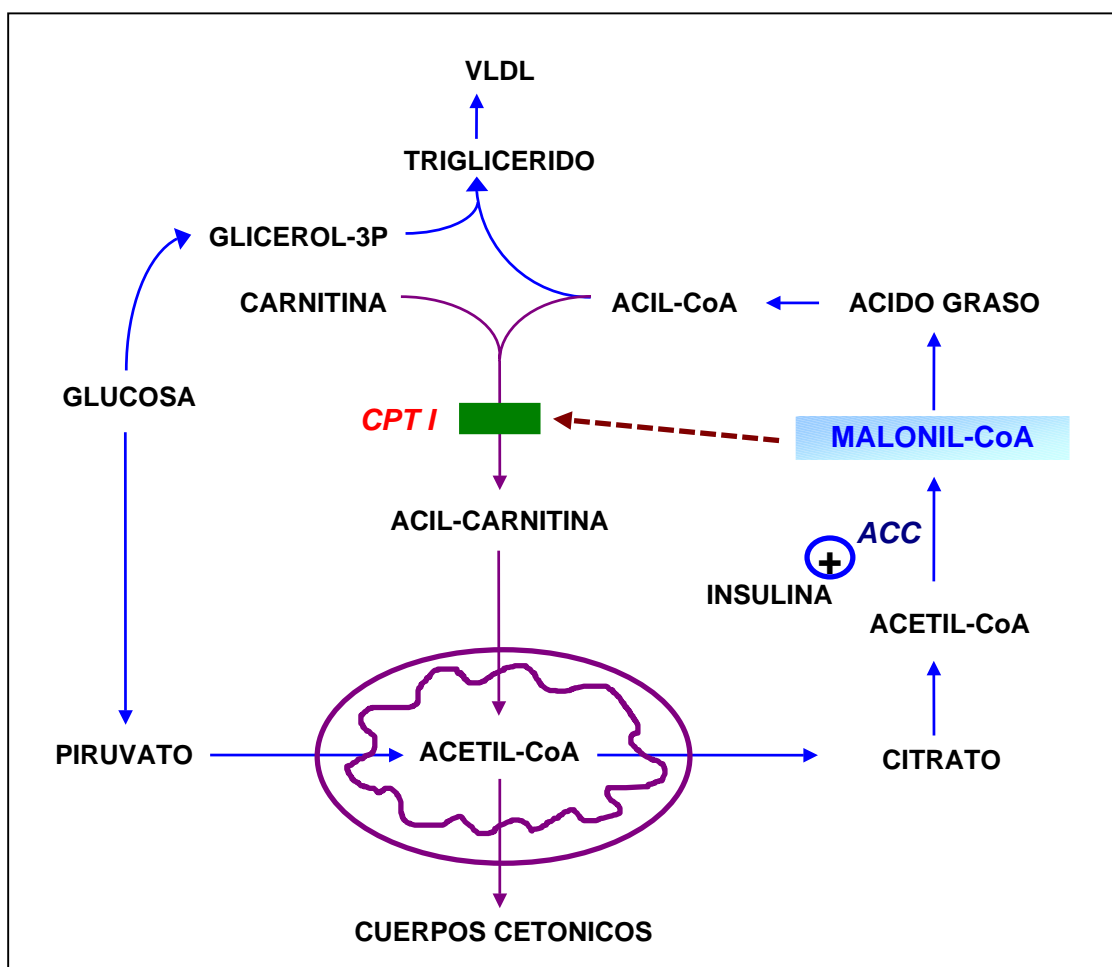


Figura 11. Interrelación entre la síntesis y la oxidación de los ácidos grasos en el hígado. Papel del malonil-CoA.

Las flechas azules indican rutas biosintéticas y las púrpuras oxidativas. La flecha intermitente y la caja indican la inhibición del malonil-CoA. ACC: acetil-CoA carboxilasa. CPT: carnitina-palmitil transferasa.

Además de las dos enzimas mitocondriales de la CPT existen actividades CPT en otros organelos subcelulares (161), tal como se indica en la tabla III.

La CPT I presenta isoformas histo específicas. Existe una forma hepática, L-CPT I (773 aminoácidos), y una proteína tipo muscular, M-CPT I (772 aminoácidos) (162-164), que son codificadas por dos genes distintos localizados en distintos cromosomas, 11q13 (162, 165) y 22q13.3 (165, 166) respectivamente. Aunque poseen el mismo peso molecular, 88 KDa, sus características cinéticas y su expresión tisular son diferentes (167) (Tabla IV). El músculo cardíaco contiene actividad CPT I con características cinéticas intermedias entre estas dos isoformas, debido a que, aunque expresa predominantemente la isoenzima muscular (168), posee la suficiente expresión de la

forma hepática como para afectar sus parámetros cinéticos (169). En el período neonatal de la rata se ha observado una alta expresión de L-CPT I en miocardio, declinando posteriormente, a la vez que se produce un aumento de carnitina tisular. Este proceso sugiere que la menor Km para carnitina de la L-CPT I podría facilitar la oxidación de los AGCL en neonatos (170). Mediante estudios de Northern-blot (157) se ha demostrado que la L-CPT I es la principal o única isoforma que se expresa en riñón, pulmón, bazo, intestino, ovario y páncreas exo y endocrino, mientras que la M-CPT I predomina en testículos. Los fibroblastos humanos son células de elección en el diagnóstico de deficiencias de L-CPT- I debido a que solamente expresan la isoforma L (163).

Tabla III. Nomenclatura y características de las CPTs.

Nombre	Otros nombres	Inhibición Malonil-CoA	Localización subcelular	PM (KDa)*
CPT71	CPT II, CPTi, CPT-B	No	Membrana interna mitocondrial	71.5
L-CPT88	CPTo, CPT-1A, L-CPT I	Si	Membrana externa de mitocondria hepática	88.5
H-CPT88	CPTo, CPT-1B, M-CPT I	Si	Membrana externa de mitocondria cardíaca	88.2
CPT54	CPT microsomal soluble, GRP58, ERp61	No	Lumen microsomal	54.2
CPT70	Carnitina-octanil transferasa, COT, CPT peroxisomal soluble	No	Matriz peroxisomal	70.3
CPT88P?	CPT de peroxisomas hepáticos unida a membrana	Si	Membrana peroxisomal	
CPT-47?	CPT de microsomas hepáticos unida a membrana	Si	Membrana microsomal	
* Peso molecular deducido a partir de la secuencia derivada de ADNc para la proteína madura ? indica probable				

La CPT II es un homotetramero que no parece presentar isoformas histo específicas. El clonaje de su ADNc revela la síntesis de una estructura monomérica de 658 aminoácidos que contiene una secuencia amino terminal de 25 aminoácidos (péptido señal) que es liberada durante su incorporación a la membrana interna mitocondrial para producir una proteína madura de 71 KDa (CPT71) (171-173). Está codificada por un único gen situado en el cromosoma 1p32 (171,174). Algunos estudios

(175) sugieren que el residuo de histidina en la posición 372 está involucrado en el sitio activo de la CPT II, de forma que dicho residuo desprotonaría el grupo hidroxilo de la carnitina facilitando el ataque nucleofílico de ésta sobre el grupo carbonilo de la molécula de acil-CoA.

Los cuadros clínicos de intolerancia al ejercicio debidos a deficiencia de CPT son causados por una actividad disminuida de CPT II muscular (14, 147, 176).

Tabla IV. Características de las CPTs mitocondriales

	L-CPT I	M-CPT I	CPT II
Peso molecular (KDa)	88	88	71
CI ₅₀ Malonil-CoA (μM)	2.5	0.03	
Km Carnitina (μM)	30	500	120
ARNm (Kb)	4.7	3	3
Locus cromosómico humano	11q13	22q13.3	1p32
<i>Expresión tisular</i>			
Hígado	++++	-	+
Músculo esquelético	traza	++++	+
Corazón	+	+++	+
Fibroblastos	++++	-	+
Deficiencia humana descrita	si	no	si

5.2. Expresión clínica

En 1973, DiMauro y Melis-DiMauro (13) describen por primera vez un paciente con deficiencia muscular de CPT. Actualmente, se acepta que el fenotipo adulto (OMIM 600650) de esta enfermedad es debido a un déficit de la isoenzima CPT II (14,147,176), siendo éste el trastorno más común del metabolismo lipídico que afecta al músculo esquelético, del que se han descrito más de 100 pacientes (176).

5.2.1. Intolerancia al ejercicio.

Se manifiesta por ataques recurrentes de mialgias, calambres, rigidez muscular y desarrollo de debilidad. En los periodos intercríticos los pacientes son asintomáticos (176). El tipo de ejercicio que precipita estos síntomas, en general, es de larga duración

y moderada intensidad tal como correr o andar largas distancias, subir montañas, practicar juegos de pelota, bipedestación prolongada, etc. Estos pacientes pueden realizar ejercicios de alta intensidad y de corta duración sin problemas (14).

5.2.2. *Mioglobinuria*

La presencia de mioglobinuria es más frecuente en esta patología que en otras deficiencias enzimáticas asociadas con intolerancia al ejercicio (33,44). Al contrario que en otras miopatías metabólicas musculares como las glucogenosis, estos pacientes no suelen experimentar intolerancia al ejercicio, es decir, no tienen señales de alarma del tipo mialgia y calambres que les obliguen a detener el ejercicio (no muestran el fenómeno de “segunda entrada”). Cuando sufren una crisis metabólica ya se ha desencadenado la rabdomiolisis y la eliminación de mioglobina en orina, con peligro de fracaso renal agudo. Otra característica importante es que cuando se ha iniciado el ataque, éste ya no puede ser abortado mediante el reposo (14).

5.2.3. *Otros agentes precipitantes de las crisis*

Otras causas que desencadenan los ataques de rabdomiolisis son ayuno, exposición al frío, alta ingestión de grasas, infecciones virales, fiebre, anestesia general y estrés emocional. Algunas veces no se ha podido conocer el agente causal de la rabdomiolisis (14,176).

5.2.4. *Sexo, inicio de los síntomas y edad de diagnóstico*

Alrededor del 80% de los pacientes descritos son varones, probablemente debido a factores ambientales y hormonales que influyen en la expresión de la enfermedad (176). En la mayoría de los casos los primeros síntomas intermitentes comienzan durante la primera y segunda década de la vida. Sin embargo, el diagnóstico generalmente se establece en la segunda década (44).

5.2.5. *Variabilidad clínica*

Se han descrito diferentes fenotipos de déficit de CPT II, aparte del tipo muscular típico que es el más frecuente. Se han observado casos de presentación neonatal letal con miopatía (177), casos con hipoglucemia hipocetótica, cardiomegalia y muerte repentina (178,179) en neonatos, pancreatitis recurrente (180), displasia renal y cerebral (181). Hoy día, se han establecido dos fenotipos causados por déficit de CPT II (182):

neonatal-infantil y miopático adulto, siendo el último el que forma parte de las intolerancias metabólicas al ejercicio y el que es abordado en esta tesis.

5.3. Características histológicas del músculo.

5.3.1 Microscopía óptica y electrónica

Los especímenes obtenidos varios meses después de un ataque de mioglobinuria son normales (14). En una minoría de pacientes pueden encontrarse depósitos lipídicos, al contrario de lo que ocurre en los pacientes con déficit de carnitina (44). Los especímenes recogidos durante el ataque son también normales, aunque pueden presentar cambios miopáticos inespecíficos y fibras necróticas aisladas (14,183).

5.3.2. Histoquímica

Actualmente, no se dispone de ninguna tinción histoquímica para CPT.

5.4. Laboratorio

5.4.1. Creatín quinasa y carnitina

La CK en suero sólo se encuentra elevada durante los ataques de mioglobinuria y es normal durante los periodos intercríticos, aunque el ayuno prolongado o el ejercicio pueden elevar la CK en algunos pacientes (14).

La carnitina sérica y muscular es normal en la mayoría de los pacientes con el fenotipo adulto, aunque se han vistos casos con disminución del contenido muscular de carnitina (14). En otros fenotipos, como el neonatal, se ha mostrado una disminución de la concentración sérica de carnitina (179).

5.4.2. Prueba de ejercicio en isquemia

Durante esta prueba el aumento de lactato y de amonio se encuentran dentro de sus intervalos normales en todos los pacientes (44).

5.5. Fisiopatología

5.5.1. Intolerancia al ejercicio

A partir de los conocimientos de la utilización de sustratos metabólicos durante el ejercicio, puede explicarse por qué estos pacientes presentan intolerancia al ejercicio de larga duración y moderada intensidad. Transcurridas entre 1 y 4 horas desde el inicio de este tipo de ejercicio comienza un desplazamiento gradual en el uso del combustible muscular desde glucosa y glucógeno a ácidos grasos, aumentando la captación muscular

de estos últimos hasta un 70% y duplicando la contribución relativa al consumo de oxígeno de los ácidos grasos respecto a la de glucosa (5,14). Durante el ayuno y el ejercicio prolongado las concentraciones de AGL en el músculo se duplican, y también se produce una disminución de las concentraciones de malonil-CoA muscular. Esto último probablemente representa una regulación a corto plazo de la CPT y contribuye al desplazamiento de la utilización de glucosa a ácidos grasos (167).

5.5.2. *Diferencias con la deficiencia primaria de carnitina*

Aunque en ambos déficits se altera la oxidación de los ácidos grasos, en el déficit de CPT no suele existir acúmulo de lípidos en el músculo y se produce mioglobinuria sin debilidad muscular, al contrario de lo que ocurre en la deficiencia de carnitina. El hecho de que en la deficiencia de CPT su actividad total sea normal e inhibida anormalmente por su sustrato y su producto, así como el carácter intermitente de los síntomas, ha sugerido que en condiciones normales la enzima alterada sea suficientemente activa para cumplir su función siendo más vulnerable cuando el metabolismo de los ácidos grasos está comprometido (14). Todo ello aclararía que no existan depósitos lipídicos musculares aunque la presencia de mioglobinuria es más difícil de explicar debido a que la energía derivada del catabolismo de los ácidos grasos se encontraría interrumpida tanto en el déficit de carnitina como en el de CPT (14).

5.5.3. *Mioglobinuria*

Por lo expuesto anteriormente, la mioglobinuria no es explicable por una crisis energética causada por depleción de ATP. Se ha observado que altas concentraciones de palmitilcarnitina y de palmitil-CoA inhiben la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ del sarcolema cardíaco (184) y que el aumento de palmitilcarnitina altera el entorno fosfolipídico de membrana (185). La mayor dependencia del metabolismo lipídico que se produce después de una lesión severa y durante los procesos infecciosos podría explicar la rabdomiolisis debida a estas causas (186).

5.6. **Transmisión genética**

Aunque se han descrito más casos en varones, la deficiencia de CPT se transmite de manera autosómica recesiva (176). En algunas familias se ha descrito herencia pseudodominante (187).

5.7. Genética molecular

5.7.1. Características del gen *CPT2*

El gen humano que codifica la CPT II ha sido clonado, secuenciado y asignado a la región cromosómica 1p32 (171,174,188). Se denominó *CPT1* por los autores del estudio de secuenciación (188), dato que puede llevar a confusión, por lo que actualmente se denomina *CPT2* (163). El gen *CPT2* está integrado por cinco exones con una longitud que varía entre 81 y 1305 pb, siendo el más largo el exón 4 (1305 pb), ya que en vertebrados el tamaño medio de los exones internos es de 137 pb. El tamaño del gen es de 18.6 Kb al que hay que añadir 1,2 Kb de la región reguladora del extremo 5'. La región 5' UTR tiene 516 pb, un tamaño bastante grande si se compara con los 77 pb que tienen de media los genes de vertebrados en esta región (188).

5.7.2. ARNm.

El tamaño del transcrito maduro es de 3090 nucleótidos (171). No se han descrito alteraciones en el procesamiento del ARNm asociadas con déficit de CPT II.

5.7.3. Mutaciones

Las alteraciones moleculares descritas en las formas adultas y neonatal-infantil en el déficit de CPT II son básicamente mutaciones puntuales y en menor medida microreagrupamientos (189,190).

En la tabla V se enumeran las mutaciones que se asocian con deficiencia de CPT II independientemente de si están asociadas a un fenotipo u otro, o a una combinación de ellos. En la figura 12 se muestra su localización sobre el gen *CPT2*.

5.7.3.1. Mutación S113L

Taroni y cols. (191) caracterizaron, en 25 pacientes de origen europeo con déficit de CPT asociado a fenotipo muscular, un alelo mutante, denominado ILV. Este alelo presentaba las sustituciones aminoacídicas V368I, S113L y M647V. La primera y la última sustitución también se encontraron en individuos normales, con frecuencias de 0,51 y 0,25 respectivamente. El alelo ILV se halló en 28 (56%) alelos de esos 25 pacientes, es decir, 8 (32%) fueron homocigotos y 12 (48%) heterocigotos. Un paciente resultó heterocigoto compuesto para ILV y para el alelo ICV que lleva la mutación R631C. Zierz y cols. (200) estudiaron esta mutación en 22 pacientes y en 3 familiares asintomáticos, y encontraron 8 homocigotos y 12 heterocigotos. Kaufman y cols. (201) analizaron 20 pacientes americanos, de los cuáles 5 (25%) fueron homocigotos y 14

(70%) heterocigotos. De todos estos estudios se deduce que la S113L es la mutación del gen *CPT2* más frecuente en la población occidental.

Por otra parte, Handig y cols. (202), observaron, en 3 pacientes homocigotos para esta mutación pertenecientes a una misma familia, que la expresión fenotípica de esta mutación variaba desde de la ausencia de síntomas hasta un fenotipo de curso letal.

La mutación S113L, que se localiza al final del exón 3, se ha introducido mediante mutagénesis dirigida en células COS-1, demostrándose que la CPT II se sintetiza normalmente y que la actividad catalítica se encuentra claramente reducida. También se ha demostrado en células COS-1, que los polimorfismos I-V no afectan a la actividad de CPT II. Los mismos autores (191) también observaron, mediante estudios de síntesis proteica con metionina marcada, que la enzima mutante era inestable, lo que sugería un aumento de la susceptibilidad de la enzima a la proteólisis, quizá debido a un ensamblaje incompleto en la membrana interna mitocondrial.

Según Taroni y cols. (191) la mutación sería deletérea por varias razones: (i) la sustitución reemplaza a un aminoácido polar pequeño, serina, por un residuo hidrofóbico grande, leucina, (ii) las sustituciones Ser→Leu son infrecuentes entre las correspondientes proteínas de organismos homólogos y, (iii) la mutación ocurre en un tramo de 19 aminoácidos (residuos 103-121) que se encuentra completamente conservado en la proteína de rata y en la humana.

5.7.3.2. Mutación P50H

Verdiero y cols. (188) encontraron esta mutación del exón 1 en ambos alelos de un paciente de origen italiano y en un alelo en otros 3 pacientes de origen europeo. La mutación se localiza en una porción de leucinas-prolinas muy conservado en la escala filogenética de las aciltransferasas. La transfección de la mutación en células COS originó una marcada reducción de la actividad CPT comprobándose la inestabilidad del enzima mutante en el estudio de expresión génica.

Tabla V. Mutaciones en el gen CPT2 asociadas a déficit de CPT.

Ref.	Codon	Alteración nucleotídica	Efecto deducido	Comentario
188	50	CCC → CAC	Pro→His	Adultos
191	113	TCG → TTG	Ser→Leu	Adultos. Común.
192	124	CGA → TGA	Arg →Stop	Adultos.
189	151	CGG → CAG	Arg → Gln	Neonatal
193	174	GAA → AAA	Glu → Lys	Infantil. Japoneses. Hepática.
189	178	insT/del 25 pb	Leu → Phe y delección de 25 pb	Neonatal y adultos.
194	214	CGG → CAG	Met → Thr	Adultos
195	227	CGG → CAG	Pro → Leu	Neonatal
193	383	TTT → TAT	Phe→Tyr	Infantil. Japoneses. Hepática
196	413	AG→delección	Desplazamiento de lectura y proteína truncada	Adultos. Ashkenazi.
194	448	TTT → CTT	Phe→Tyr; parece ligada a 413 delAG	Adultos. Ashkenazi.
194	479	TAC → TTC	Tyr → Phe	Adultos
197	487	GAG → AAG	Glu → Lys	Adultos
196	503	CGC → TGC	Arg → Cys	Adultos
196	549	GGC →GAC	Gly → Asp	Adultos
189	550	CAG → CGG	Gln→Arg	Neonatal
188	553	GAC → AAC	Asp→Asn	Adultos
189	604	CCT → TCT	Pro → Ser	Infantil
190	Exón 4	Duplicación de 11 pb	Desplazamiento de lectura y proteína truncada	Neonatal
198	628	TAC → TCC	Tyr→Ser	Infantil y adultos.
199	631	CGC → TGC	Arg → Cys	Infantil y adultos.

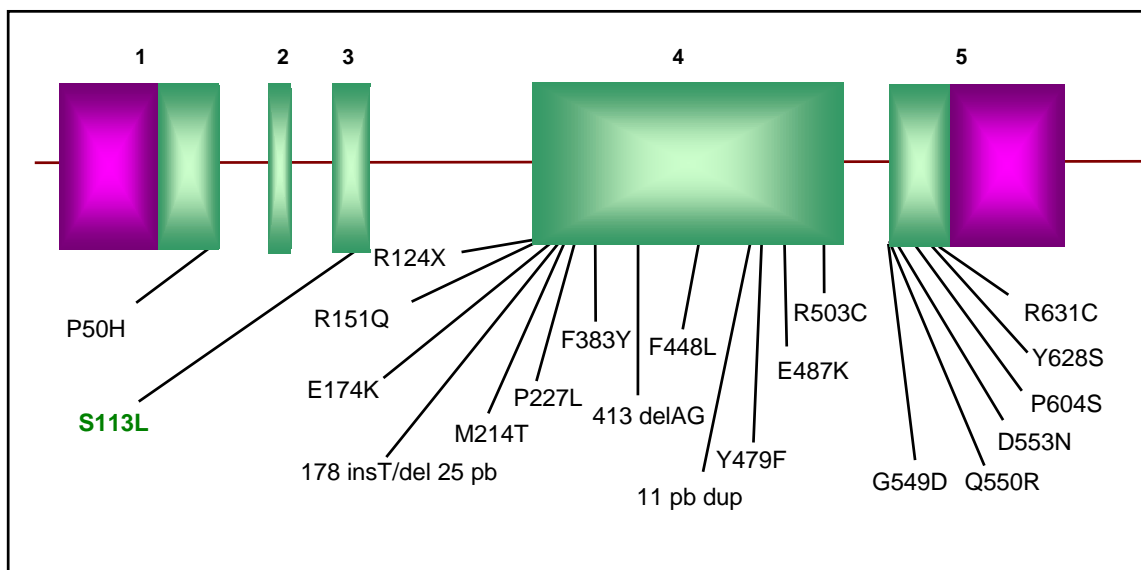


Figura 12. Localización de las mutaciones en el gen CPT2 asociadas con deficiencia de CPT II.

Los rectángulos son los exones. Las zonas coloreadas indican las regiones no traducibles. La mutación más frecuente en pacientes con déficit de CPT II en color verde. ins: inserción; del: delección; dup: duplicación; pb: pares de bases.

5.7.3.3. Mutación R631C

Taroni y cols. (199) encontraron esta mutación del exón 5 en los dos alelos de un niño con hipoglucemia hipocetótica y cardiomiopatía. La mutación formaba parte del alelo denominado ICV. Además, se observó en dos pacientes con el fenotipo clínico de intolerancia al ejercicio del adulto. En una descripción posterior (191) mostraron que uno de estos pacientes resultó ser heterocigoto compuesto para los alelos ICV-ILV. Así mismo en experimentos con células COS la actividad enzimática de la CPT II era muy reducida, observándose también que los polimorfismos I-V exacerbaban los efectos bioquímicos de esta mutación. El análisis de expresión demostró inestabilidad de la proteína.

5.7.3.4. Mutación Y628S

Bonefont y cols. (198) caracterizaron esta mutación del exón 5 en un paciente infantil con afectación hepatocardiomuscular. La mutación mostraba en células COS una actividad residual de CPT del 10% y una reducción de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga en fibroblastos. También demostraron inestabilidad de la enzima. Esta mutación ha sido encontrada en otro caso infantil en homocigosis (203) y en un caso de forma miopática severa en un paciente de 10 años en heterocigosis compuesta con S113L (182).

OBJETIVOS

1. Obtener valores de referencia y valores de decisión diagnóstica de las actividades miofosforilasa, fosfofructoquinasa y carnitina-palmitil transferasa en homogenado muscular.
2. Caracterizar bioquímicamente a pacientes con déficit enzimático de miofosforilasa, fosfofructoquinasa y carnitina-palmitil transferasa a partir de una alícuota de biopsia muscular.
3. Caracterizar genético-molecularmente de forma definitiva a pacientes con enfermedad de McArdle y con déficit de carnitina-palmitil transferasa II muscular, y de manera parcial a pacientes con enfermedad de Tarui.
4. Valorar la patogenicidad potencial de las nuevas mutaciones, que sean encontradas en los genes *PYGM* y *CPT2* de pacientes con enfermedad de McArdle y con déficit de CPT II muscular, mediante dos criterios: a) la ausencia en la población control y b) posibles consecuencias de la mutación, como variación del tamaño o distribución de la carga aminoacídica en la proteína mutante, grado de conservación en la escala filogenética o posibles cambios conformacionales.
5. Desarrollar métodos sencillos, rápidos y económicos de PCR-RFLP para la detección de las nuevas mutaciones que sean encontradas en los genes *PYGM* y *CPT2* en sujetos con sospecha de enfermedad de McArdle y déficit de CPT II.
6. Evaluar las consecuencias fenotípicas de la mutación Q12X del gen *AMPD1* asociada a déficit de mioadenilato desaminasa.
7. Plantear una estrategia diagnóstica en pacientes con intolerancia al ejercicio, evaluando la practicabilidad del diagnóstico molecular a partir de muestras sanguíneas en cada una de las enzimopatías estudiadas

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Sujetos

Se han estudiado dos tipos de individuos: pacientes con sospecha clínica de intolerancia metabólica al ejercicio y sujetos control, en los que no existía evidencia clínica, histológica y bioquímica de intolerancia al ejercicio.

1.1. Controles

Las muestras de los sujetos control se utilizaron en las pruebas bioquímicas para obtener valores de referencia y como garantía de calidad de las técnicas analíticas, y en los métodos genético-moleculares como controles negativos. Los datos correspondientes al número, edad y sexo de los controles utilizados para la obtención de valores referencia bioquímicos se encuentran en las secciones de resultados de las deficiencias enzimáticas correspondientes, y esos mismos datos correspondientes a los controles utilizados en los métodos moleculares se reflejan en el apartado 12 de esta sección.

1.2. Pacientes

Los pacientes fueron incluidos en los diversos estudios de esta tesis cuando la historia clínica, las pruebas bioquímicas funcionales (CK, prueba de ejercicio isquémico) y/o las determinaciones histológicas e histoquímicas fueran indicativas de intolerancia metabólica al ejercicio. Tras un análisis de todos estos parámetros diagnósticos (Fig.13), el paciente fue seleccionado para análisis bioquímico de miofosforilasa, fosfofructoquinasa o carnitina-palmitil transferasa musculares, ó para análisis molecular de la mutación Q12X en el gen *AMPD1*. Si el análisis bioquímico mostró una deficiencia enzimática en músculo, el paciente fue sometido a un cribado molecular de ciertas mutaciones conocidas descritas en la población europea o americana en los genes que codifican dichas enzimas, es decir, análisis de restricción de las mutaciones R49X y G204S en el gen *PYGM*; R39P en el gen *PFKM*; S113L, P50H, R631C y Y628S en el gen *CPT2*. Si el paciente resultó homocigoto o heterocigoto compuesto para alguna de estas mutaciones el estudio se dio por concluido. Por el contrario, si el paciente fue heterocigoto para alguna de las mutaciones anteriores en los genes *PYGM* o *CPT2*, o bien, en los pacientes con déficit de miofosforilasa o déficit de CPT II no se encontró ninguna de las mutaciones anteriores, éstos fueron analizados mediante secuenciación directa de uno u otro gen en busca de otras mutaciones. En los pacientes homocigotos para la mutación Q12X del gen *AMPD1*, se analizaron las mutaciones R49X (*PYGM*) y S113L (*CPT2*), para descartar o demostrar la presencia de “doble problema”.

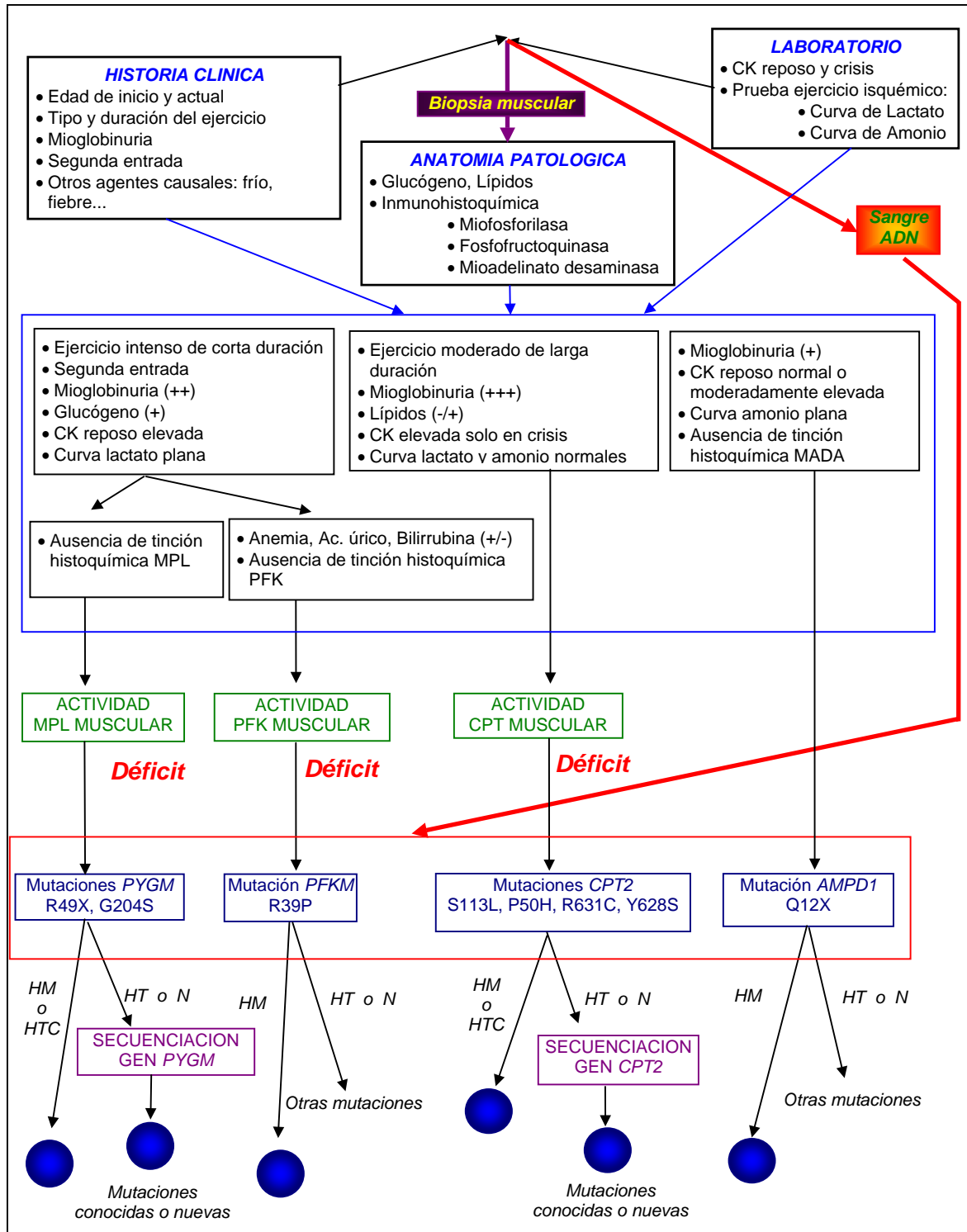


Figura 13. Estrategia de caracterización bioquímica y genético-molecular de pacientes con intolerancia al ejercicio.

Los círculos azules indican que el paciente ha sido identificado molecularmente. CK: creatin quinasa; MPL: miofosforilasa; PFK: fosfofructoquinasa; CPT: carnitina-palmitil transferasa; MADA: mioadenilato desaminasa; *PYGM*: gen de la MPL; *PFKM*: gen de la PFK muscular; *CPT2*: gen de la CPT II; *AMPD1*: gen de la MADA; HM: homocigosis; HT: heterocigosis; HTC: heterocigosis compuesta; N: negativo.

2. Muestras

Los materiales biológicos utilizados durante esta tesis han sido tejido muscular y sangre, procedentes tanto de pacientes como de sujetos control.

2.1. Determinaciones bioquímicas.

El estudio bioquímico se ha realizado mediante la medida de la actividad enzimática en tejido muscular de miofosforilasa, fosfofructoquinasa y carnitina-palmitil transferasa. Dicho tejido se obtuvo realizando una biopsia muscular abierta de los músculos vasto externo y deltoides.

En todos los casos, el fragmento de tejido muscular se congeló en nitrógeno líquido inmediatamente después de su extracción. Posteriormente, si la biopsia se había realizado en el Hospital "12 de Octubre" de Madrid se conservó en contenedores de nitrógeno líquido y/o en congeladores a 80 °C bajo cero. Si la biopsia era remitida desde otro centro se envió mediante mensajería urgente en un contenedor con nieve carbónica transfiriéndose para su conservación en nitrógeno líquido o en congeladores de 80 °C bajo cero. Todas las biopsias se analizaron bioquímicamente en un plazo inferior a un mes desde su obtención.

2.1.1. Estudio de la variabilidad analítica y variabilidad biológica

Debido a que la práctica de la biopsia muscular es una técnica invasiva para los pacientes y controles, la disponibilidad de material para realizar estudios de calidad analítica y de variabilidad biológica es limitada, lo que se refleja en el escaso número de especímenes analizados para dichos fines.

La variabilidad analítica se dedujo a partir de un estudio de imprecisión intradía a dos niveles de actividad enzimática, para lo cual se realizaron dos homogenados musculares a partir de muestras de pacientes y/o de controles sanos, midiendo la actividad enzimática diez veces a lo largo de un mismo día (204).

Para realizar la variabilidad biológica se realizó un estudio de imprecisión intraindividual a dos niveles de actividad enzimática (204, 205). Para ello en muestras de controles y/o pacientes en los cuáles se disponía de suficiente cantidad de tejido muscular se realizaron diferentes homogenados musculares a partir de la misma muestra y se midió la actividad enzimática durante 10 días consecutivos. Por tanto, este estudio de variabilidad biológica, incluye en parte la variabilidad analítica debida a la imprecisión interdía metodológica.

2.1.2. Valores de referencia

Lo expuesto en el apartado 2.1.1. sobre la limitación de la muestra es igualmente válido en el caso de la obtención de valores de referencia. Para obtenerlos dentro de la población a la que se atendía se midieron las actividades enzimáticas en individuos control en los cuales no existía evidencia clínica, histológica o bioquímica que sugiriera la existencia de miopatía metabólica en dichos sujetos (206).

2.1.3. Valor de decisión diagnóstica.

Los datos de variabilidad biológica junto con los valores de referencia permitieron calcular un valor de decisión diagnóstica por debajo del cual se consideró que el individuo analizado tenía un déficit enzimático (204, 206). Dicho valor se obtuvo aplicando a la baja el coeficiente de variación medio de la variabilidad biológica intraindividual sobre el percentil 2,5 de los valores de referencia.

2.2. Extracción de ADN.

El estudio molecular se ha basado en el análisis de los genes que codifican las proteínas enzimáticas cuya deficiencia se encuentra asociada a intolerancia al ejercicio. Por ello, los análisis genético-moleculares requerían la extracción del ADN del sujeto a caracterizar, así como de sujetos control. La extracción de ADN se practicó tanto en tejido muscular como en sangre.

Una vez aislado el ADN, se determinó su concentración mediante la medida espectrofotométrica de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (207). Para ello, la muestra de ADN se diluyó 100 veces en agua bidestilada, y se aplicó la siguiente fórmula: 1 Unidad de Absorbancia = 50 µg / mL de ADN de doble hebra.

La posible contaminación de la muestra con proteínas se determinó en la misma dilución midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, y calculando la relación de absorbancia entre 260 nm y 280 nm. Se consideraron valores aceptables cuando se superaba el valor de 1,7.

2.2.1. Tejido muscular

Para el aislamiento de ADN a partir de músculo esquelético se ha seguido el método descrito por Sambrook y cols. (207), con algunas modificaciones.

Se parte de una cantidad superior a 50 mg de tejido muscular congelado y se tritura en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. Se deposita todo el tejido en tubo de polipropileno de 2 mL, al que se añaden 180 µL de tampón TSE (Tris-HCl 100 mM

pH=7,4, ClNa 10 mM, EDTA 25 mM) y 20 μ L de solución acuosa de proteinasa K (20 mg/mL). Se centrifuga brevemente a 14.000 xg, se mezcla y se incuba 5 min. a 55 °C. Se añaden otros 180 μ L de tampón TSE, 20 μ L de proteinasa K y 40 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS). Se mezcla y se incuba 60 min. a 55 °C. Se añaden 20 μ L de proteinasa K y se incuba a 55 °C durante 30 min. Se incorporan 50 μ L de ClNa 5M y 1 mL de “mezcla de aislamiento” comprobando previamente que su pH es superior a 8 (fenol saturado equilibrado con Tris-HCl 1M pH=8 con 0,1% de isoquinolina incorporada, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 100: 96: 4). Se agita y se centrifuga a 14.000 xg brevemente para separar las fases. Se recoge el sobrenadante y se lava dos veces con 1 mL de éter dietílico. Una vez evaporado el éter, se añaden 1,5 mL de etanol al 98%, lo que provoca el precipitado de las hebras de ADN, que se recogen en un tubo de polipropileno de 1,5 mL estéril. Se elimina el resto de etanol en un evaporador de vacío y el ADN se disuelve en 50-100 μ L de Tris-EDTA (TE) 1X estéril (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM , pH=7,4). La solución de ADN se conservó a - 20 °C.

2.2.2. *Linfocitos*

Para el aislamiento de ADN a partir de linfocitos se siguió el método descrito por Miller y cols. (208).

La obtención de linfocitos se realizó mediante el uso de un gradiente de Ficoll. Para ello, 5-7 mL de sangre total anticoagulada con EDTA fueron depositados cuidadosamente encima de 3 mL de Ficoll-Paque (Pharmacia). La centrifugación a 800 xg produce la separación de los linfocitos en una capa distinguible de los hematíes y otras células sanguíneas, la cual fue transferida a otro tubo. Se centrifuga a 1.500 xg para obtener un sedimento de linfocitos, que es lavado con 500 μ L de agua bidestilada y 3 mL de suero salino fisiológico las veces necesarias hasta obtener un precipitado libre de hematíes.

Los linfocitos se resuspenden en una mezcla compuesta por 3 mL de “tampón de lisis” (Tris-HCl 10 mM, ClNa 400 mM, EDTA 2 mM, pH=8,2). El lisado celular se digiere durante una noche a 37 °C con 300 μ L de SDS al 10% y 500 μ L de solución de proteinasa K (SDS 1%, EDTA 2 mM, 1 mg de proteinasa K). Al día siguiente se incorpora 1 mL de ClNa 5 M, se agita vigorosamente y se centrifuga a 1.500 xg durante 15 min. Se recoge el sobrenadante y se añaden 10 mL de etanol absoluto preenfriado para precipitar las hebras de ADN. Éste fue secado al vacío y reconstituido en 50-100 μ L de TE 1X.

2.2.3. Sangre total.

Para obtener ADN directamente de sangre se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante del sistema de extracción Nucleon BACC2 (Amersham Life Science) que se basa en la precipitación de proteínas con perclorato sódico y su separación del ADN mediante cloroformo y una resina patentada.

3. Actividad enzimática muscular de miofosforilasa

3.1. Fundamento.

La actividad de la miofosforilasa en tejido muscular se determinó con pequeñas variaciones siguiendo el método espectrofotométrico descrito por Di Mauro y cols. (209).

Es un método enzimático continuo que mide el incremento de absorbancia a 340 nm causado por el NADPH generado a través de un sistema de reacciones acopladas que comienzan cuando existe actividad glucógeno fosforilasa muscular (Fig. 14). El sistema analítico lleva incorporado 5'-AMP como activador de la fosforilasa b.

3.2. Descripción.

Alrededor de 30 mg de tejido muscular congelado son homogeneizados manualmente en hielo con 9 volúmenes de "tampón MPL" (β -glicerolfosfato 40 mM, NaF 40 mM, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 20 mM, pH=6,8). El homogenado crudo se centrifuga a 10.000 xg a 4 °C durante 10 min. y se recoge el sobrenadante. La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 1 mL: tampón fosfato sódico 20 mM pH=7,2, $MgCl_2$ 2 mM, NADP 1mM, glucógeno tipo II de ostra 0,1 %, 1 U de fosfoglucomutasa de músculo de conejo, 1 U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de levadura del pan. Se añaden 10 μ L de sobrenadante para iniciar la reacción que se sigue a 30 °C durante dos minutos, al final de los cuales se añade 5'-AMP 0.8 mM, continuando la reacción durante 5 minutos más. El análisis de cada muestra se realizó por duplicado en un espectrofotómetro UV-Vis DU-650 (Beckman Instruments).

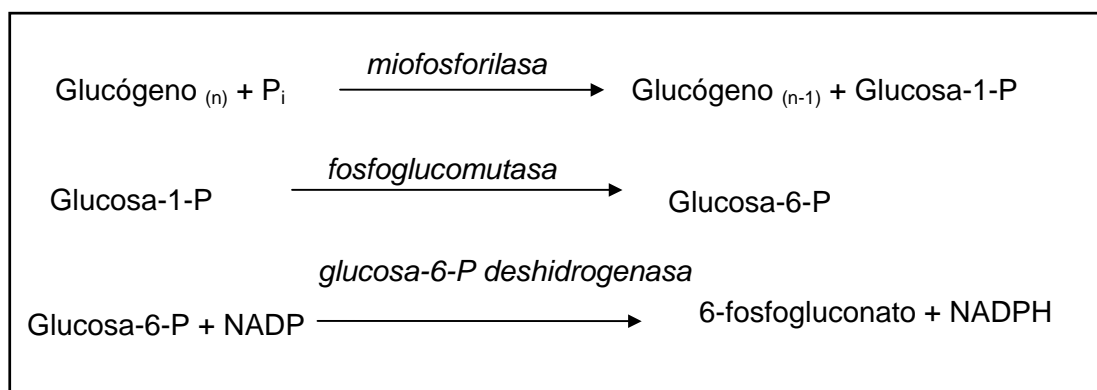


Figura 14. Método de determinación de miofosforilasa.

La actividad enzimática de la fosforilasa (A) se expresó en μmoles de glucosa-1-P liberada por minuto y por gramo de tejido. Debido a que por cada mol de glucosa-1-P que se produce se obtiene un mol de NADPH, se puede determinar el incremento de absorbancia a 340 nm por minuto, y este dato se multiplica por un factor (F).

$$A(\mu\text{mol min.}^{-1} \text{g}^{-1}) = (\text{Incremento de absorbancia} \times \text{min.}^{-1}) \times F$$

$$F = \frac{1.000 (\mu\text{L} \times \text{mL}^{-1}) \times 10 (\text{homogenado al 10\%})}{\mu\text{L tejido} \times \text{Coef. extinción} (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})} = \frac{1.000 \times 10}{10 \times 6,2} = 161,3$$

4. Actividad enzimática muscular de fosfofructoquinasa

4.1. Fundamento.

La actividad fosfofructoquinasa en tejido muscular se determinó con pequeñas modificaciones mediante el método espectrofotométrico descrito por Hays y cols. (210).

Es un método enzimático continuo que mide la disminución de absorbancia a 340 nm del NADH que se consume a través de varias reacciones acopladas, las cuales comienzan cuando existe actividad fosfructoquinasa muscular (Fig. 15).

4.2. Descripción.

Alrededor de 30 mg de tejido muscular congelado son homogeneizados manualmente en hielo con 9 volúmenes de "medio PFK" (KF 30 mM, EDTA 1 mM). El homogenado se centrifuga a 10.000 $\times g$ a 4 °C durante 10 min. y se recoge el sobrenadante. La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 1 mL: tampón Tris-

HCl 40 mM pH=8,0, MgCl₂ 6 mM, ATP 2 mM, NADH 0,2 mM, 1 U de aldolasa tipo IV de músculo de conejo, 1 U de α -glicerolfosfato deshidrogenasa-triosafosoisomerasa 1:10 tipo III de músculo de conejo y 10 μ L de sobrenadante muscular. La reacción se sigue a 30 °C durante tres minutos para obtener una pendiente plana, al final de los cuales se añade fructosa-6-fosfato 3 mM para iniciar la reacción que es monitorizada durante 2 minutos. El análisis de cada muestra se ha realizado por duplicado en un espectrofotómetro UV-Vis DU-650 (Beckman Instruments).

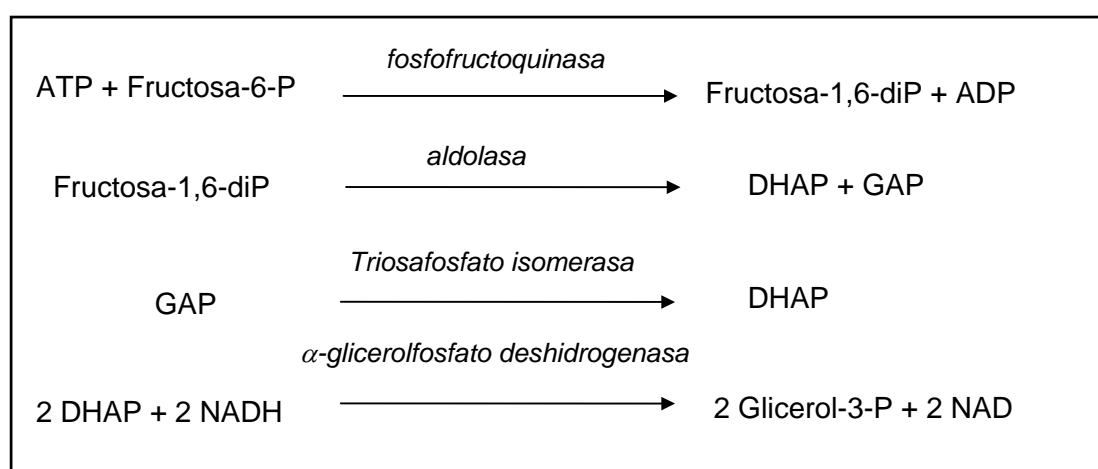


Figura 15. Método de determinación de fosfofructoquinasa.

DHAP = dihidroxiacetona fosfato; GAP = gliceraldehído-3-fosfato; NAD: nicotín-adenín dinucleótido.

La actividad enzimática de la fosfofructoquinasa (A) se expresó en μ moles de fructosa-6-P consumida por minuto y por gramo de tejido. Debido a que por cada mol de fructosa-6-P utilizado se consumen dos moles de NADH, podemos determinar la disminución de absorbancia a 340 nm por minuto, y este dato lo multiplicamos por un factor (F).

$$A(\mu\text{mol min.}^{-1} \text{g}^{-1}) = (\text{Disminución de absorbancia} \times \text{min.}^{-1}) \times F$$

$$F = \frac{1.000 (\mu\text{L} \times \text{mL}^{-1}) \times 10 (\text{homogenado al 10\%})}{\mu\text{L tejido} \times \text{Coef. extinción} (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 2} = \frac{1.000 \times 10}{10 \times 6,2 \times 2} = 80,6$$

5. Actividad enzimática muscular de carnitina-palmitil transferasa.

La actividad de CPT en músculo se determinó por dos métodos: el método de intercambio isotópico y el método "forward". El primero de ellos parece que determina mayoritariamente la isoenzima CPT-II cuando se utilizan concentraciones altas del sustrato palmitilcarnitina (211). En el método "forward" se mide la actividad total de CPT, determinándose la actividad CPT-II con la utilización de malonil-CoA como inhibidor de la actividad CPT-I o con el uso del detergente Tritón X-100 que libera de la membrana a la isoenzima CPT-II en forma activa y a su vez inactiva a la CPT-I (212).

En esta tesis se ha utilizado mayoritariamente el método de intercambio isotópico, reservando el método "forward" para corroborar el déficit de CPT-II en algunos pacientes. Debido a que en este último método se utiliza como sustrato el palmitil-CoA unido a albúmina, no es posible conocer con seguridad qué concentración de sustrato se encuentra realmente libre, y por tanto, disponible para la reacción, por lo cuál las actividades reflejan una mayor variabilidad (212).

5.1. Método de intercambio isotópico.

5.1.1. Fundamento.

Se trata de un análisis enzimático radiométrico (211) basado en la catálisis enzimática que ejerce la CPT muscular en la reacción de intercambio del isótopo radiactivo carbono-14 entre moléculas de L-carnitina marcada con dicho isótopo y palmitil-L-carnitina (Fig. 16).

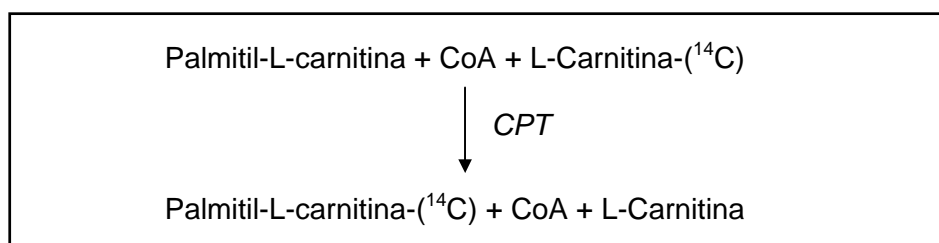


Figura 16. Determinación de CPT. Método de intercambio isotópico.

5.1.2. Descripción.

Se precisa una cantidad mínima de 50 mg de músculo congelado que son homogeneizados en hielo con 9 volúmenes tampón CPT (Tris-HCl 50mM, KCl 150 mM, pH=7,4). Se utiliza el homogenado total para la determinación radiométrica de la actividad CPT. La reacción se realiza en tres tubos, de forma que ésta se finaliza con HCl 1M al minuto cero, cuatro y ocho respectivamente. Cada tubo de reacción contiene, en un volumen final de 300 μ L: Tris-HCl 50 mM pH=7,4, Coenzima A 1 mM, Ditiotreitól 0,4 mM, Palmitil-DL-Carnitina 0.6 mM y L-Carnitina-[metil-14C] 2 mM 2,5 μ Ci/mmol (Amersham-Pharmacia). La reacción se inicia con 100 μ L de homogenado y se incuba a 37 °C. La actividad enzimática se finaliza con 1 mL de HCl 1M a los tiempos indicados, y se extrae la palmitilcarnitina con 1 mL de 1-butanol. Se separan las fases mediante centrifugación a 800 xg durante 5 min. y se recogen 700 μ L de la fase orgánica superior que es lavada con la misma cantidad de agua saturada con 1-butanol (1:1). De la fase orgánica se toman 500 μ L que se añaden a 3 mL de líquido de centelleo. Estos, junto a dos viales que contienen 250 nmoles de L-Carnitina marcada (A + B), son analizados durante 3 minutos en un contador de radiactividad β que nos proporcionará las cuentas por minuto (cpm).

La actividad de la CPT muscular se expresa en nmoles de palmitil-L-carnitina producidos por minuto y por mg de proteínas no colágenas (NCP), según el siguiente procedimiento de cálculo:

- a) cálculo de las cpm producidas por un nmol de L-carnitina, que equivalen a las que producirá un nmol de palmitil-L-carnitina marcada, debido a que la reacción es mol a mol:

$$cpm / nmol = \frac{cpmA + cpmB}{250 \times 2}$$

- b) cálculo de los nmoles de palmitilcarnitina producidos en un minuto por un mL de homogenado:

$$nmol \min^{-1} mL^{-1} = \frac{\frac{cpm8 - cpm0}{8} + \frac{cpm4 - cpm0}{4}}{2} \times \frac{20}{cpm / nmol}$$

- c) cálculo de la actividad enzimática de CPT muscular referida a NCP.

$$nmol \min^{-1} mg \text{ NCP}^{-1} = \frac{nmol \min^{-1} mL^{-1}}{NCP (mg mL^{-1})}$$

5.2. Método “forward”

5.2.1. Fundamento.

Se trata de un análisis enzimático radiométrico basado en la acción enzimática de la CPT utilizando como sustratos palmitil-CoA y L-carnitina marcada radiactivamente con carbono-14 (^{14}C) (Fig. 17). La reacción se lleva a cabo en ausencia o presencia de malonil-CoA, que solamente inhibe a la isoenzima CPT-I.

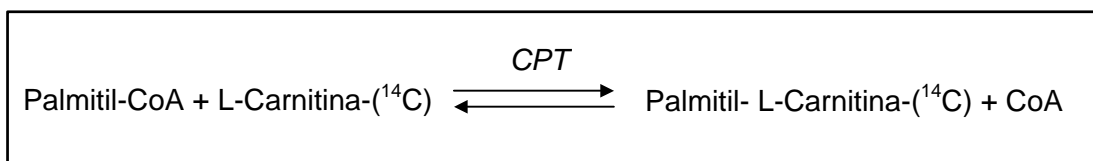


Figura 17. Determinación de CPT. Método “forward”.

5.2.2. Descripción

Alrededor de 30 mg de músculo congelado son homogeneizados en hielo con 19 volúmenes “tampón forward” (Tris-HCl 50mM, KCl 150 mM, MgSO_4 5 mM, EDTA 1 mM, ATP 1 mM, pH=7,6). Se utiliza el homogenado total para la determinación radiométrica de la actividad CPT. Cada muestra se analiza en tres tubos de ensayo: blanco (B), minuto 10 (C) y minuto 10 con malonil-CoA (M). Cada uno de ellos contiene en un volumen final de 500 μL : Tris-HCl 100 mM, KCN 2 mM, albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos 0.1%, palmitil-CoA 80 μM , 100 μL de homogenado muscular al 5 % (p/v) y el tubo M contiene además malonil-CoA 200 μM . Se incuba durante 10 minutos a 30 °C, y se inicia la reacción con L-carnitina-[metil- ^{14}C] 2 mM 2,5 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ (Amersham-Pharmacia). La reacción se finaliza a los minutos indicados con 1 mL de sulfato amónico saturado y se extrae la palmitilcarnitina formada con 1 mL de isobutanol. Se recogen 700 μL de la fase orgánica superior que es lavada con la misma cantidad de sulfato amónico saturado. De la fase orgánica se toman 500 μL que se añaden a 3 mL de líquido de centelleo. Estos, junto a dos viales que contienen 250 nmoles de L-carnitina marcada (A + B), son contados durante 3 minutos por tubo, en un contador de radiactividad β , que nos proporcionará las cuentas por minuto (cpm).

La actividad CPT muscular se calculó de forma similar a la del ensayo de intercambio isotópico, teniendo en cuenta las siguientes premisas:

- CPT total: se utilizan las cpm proporcionadas por el tubo C menos el tubo B.
- CPT insensible (CPT II): se utilizan las cpm proporcionadas por el tubo M menos el tubo B.
- CPT sensible (CPT I) = CPT total - CPT insensible.

5.3. Determinación de proteínas no colágenas en homogenado muscular.

Una alícuota de homogenado muscular, entre 50 y 100 μL , se mezcla en proporción 1:1 con hidróxido sódico 0,1 M y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. Se centrifuga a 5.000 xg durante 5 minutos y se recogen 40 μL del sobrenadante que se diluye hasta 600 μL con agua bidestilada para la determinación de proteínas no colágenas mediante el método de Lowry modificado (213). El reactivo de Lowry se prepara mezclando solución A (carbonato sódico 2%, hidróxido sódico 0,1M) y solución B (sulfato de cobre 0,5%) en proporción 50:1. El reactivo de Folin se diluye con una parte de agua bidestilada. Se añade 1 mL de reactivo de Lowry a 200 μL de la dilución del sobrenadante muscular y se deja reaccionar durante diez minutos. A esta mezcla se añaden 100 μL de reactivo de Folin y se mantiene en oscuridad durante 30 minutos, al cabo de los cuales se mide la absorbancia a 550 nm frente a un blanco de agua que se ha tratado de igual manera. Las muestras se analizaron por duplicado. Las lecturas de absorbancia se extrapolaron en una recta de calibración para obtener los mg de NCP por mL de homogenado muscular. Para trazar la recta de calibración se han utilizado concentraciones de 1 a 7 mg/mL de albúmina sérica bovina fracción V.

6. Cribado mutacional en el gen *PYGM*

La detección de las dos mutaciones más prevalentes en el gen *PYGM* asociadas con enfermedad de McArdle se ha realizado mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (la tabla VI muestra los cebadores utilizados) y posterior digestión de los fragmentos amplificados con la endonucleasa de restricción correspondiente (RFLP). La separación de los fragmentos de restricción se ha realizado con electroforesis en gel de agarosa a concentraciones que permitieran la diferenciación de los mismos. Como sistema de detección se ha utilizado bromuro de etidio 0.01% visualizando la fluorescencia producida en un transiluminador ultravioleta. Esta metodología ha permitido la identificación de individuos con los dos alelos normales (genotipo normal), pacientes con los dos alelos mutados (homocigotos) y sujetos con un alelo normal y el otro mutado (heterocigotos).

La numeración aceptada de los nucleótidos del gen *PYGM* comienza con el número uno en la primera base del codon de inicio de la traducción (ATG), sin embargo, en la numeración de los codones y residuos aminoácidos se ha asignado el número uno al primer codon inmediatamente posterior al triplete de inicio de la traducción, considerándose este último el número cero (53).

Tabla VI. Oligonucleótidos utilizados en la detección de mutaciones en los genes *PYGM*, *PFKM*, *AMPD1* y *CPT2* mediante PCR y análisis de restricción.

Cebador	Secuencia 5' → 3'
49F	GAGGCCGCCGTCCCCTCTACC
49R	CCAGCAGCACCTTGGGGTCC
204F	GAGTTCACGCTACCTGTGCACTT
204R	TTCATCCTCACCTGTGTGT
39F	tgccctccttcagGTATGA
39R	accaaCTCATGGACAAAGAA
A12F	TTTATCTTGTTTTATTTACTTCATACAGCTGAAGAGAT <u>A</u>
A12R	ATAGCCATGTTTCTGAATTA
113F	GACAAACAGAATAAACATACAAC <u>C</u> A <u>C</u> ATT
113R	gggaggatgagacgttacttcattg
50F	GGAGCCCCCAGTCGGCCCCCTCAGCGCCGG
50R	gacggcagcgggcagcggggaccggaggccaggctcac <u>C</u> CTG
628F	CAGCAGCCAAAGGGATCATCTT
628R	TGATGAGGAAGTGATGGTAGCTTT

La secuencia correspondiente a regiones de exones en mayúsculas y la de zonas intrónicas en minúsculas. Los nucleótidos modificados respecto a la secuencia normal se encuentran subrayados.

6.1. Mutación R49X

Esta mutación es producida por la transición C → T en el nucleótido 148 en el codon 49 en el exón 1 del gen *PYGM*, lo que crea un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción *Nla* III que reconoce la secuencia 5'-CATG↓-3'.

Para su análisis (53), se amplificó un fragmento del gen *PYGM*, que contenía la posición nucleotídica diana, con un tamaño de 306 pares de bases (pb). Mediante PCR (Termociclador 9600 Perkin-Elmer) se amplificaron 300 ng de ADN genómico en 30 ciclos constituidos por desnaturalización a 95 °C durante 1 min., hibridación a 62 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95° C durante 5 min. y una extensión final durante 10 min. a 72 °C. Cada 100 µL de reacción contenían 2,5 U de *Taq* polimerasa (Cultek Inc), 0,5 µM de cada cebador (cebadores 49F y 49R), 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), dimetilsulfóxido (DMSO) al 3% y MgCl₂ 1,5 mM en el tampón suministrado. Tras la amplificación, alrededor de 10 µL del producto de PCR se digirieron con 30 U de *Nla* III en presencia de 100 µg/mL de BSA en un volumen final de 40 µL durante 3 horas a 37 °C. Los fragmentos se detectaron en una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución (Roche Diagnostics) al 2,5%.

Para analizar los resultados se tuvo en cuenta que la enzima *Nla* III posee un sitio de restricción en la secuencia normal de este fragmento del gen *PYGM* (Fig. 18).

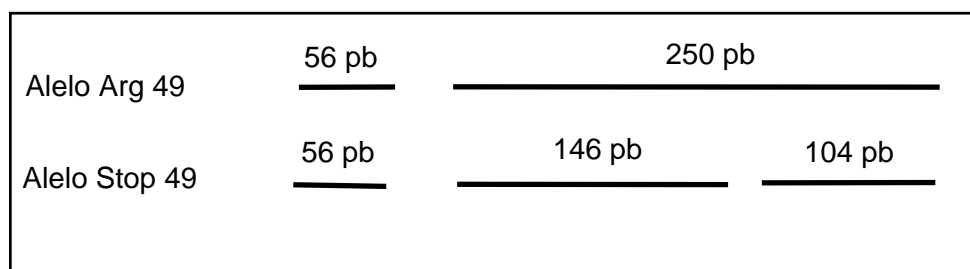


Figura 18. Fragmentos de restricción obtenidos con *Nla* III en el análisis de la mutación R49X del gen *PYGM*.

6.2. Mutación G204S

Esta mutación es causada por la transición G → A del nucleótido 613 en el codon 204 del exón 5 del gen *PYGM*, lo que crea un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción *Cfr* I que reconoce la secuencia 5'-Y↓GGCCR-3'.

Para su análisis (53) se amplificó un fragmento de 87 pb del gen *PYGM*, que contenía la posición nucleotídica diana. Mediante PCR se amplificaron 300 ng de ADN genómico con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 1 min., hibridación a 55 °C durante 1 min. y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Se realizaron una desnaturalización inicial a 96 °C durante 5 min. y una extensión final durante 10 min. a 72 °C. Cada 100 µL de reacción contenían 2.5 U de *Taq* polimerasa, 1 µM de cada cebador (cebadores 204F y 204R), 200 µM de cada dNTP, DMSO 3% y MgCl₂ 1,5 mM en el tampón suministrado. Tras la amplificación, alrededor de 10 µL del producto de PCR se digirieron con 30 U de *Cfr* I en un volumen final de 40 µL durante 3 horas a 37 °C. La detección de los fragmentos se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3%. (Fig.19).

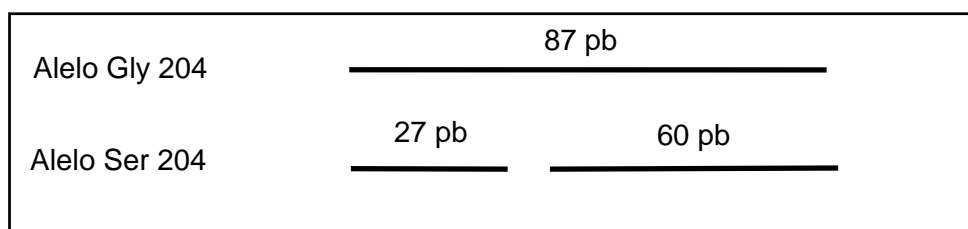


Figura 19. Fragmentos de restricción obtenidos con *Cfr* I en el análisis de la mutación G204S del gen *PYGM*.

7. Análisis de restricción de la mutación R39P en el gen *PFKM*

La numeración nucleotídica del gen *PFKM* comienza con el número uno en la primera base del codon de inicio de la traducción, que a su vez se le ha asignado el número uno en la numeración de tripletes y aminoácidos.

Esta mutación es causada por la transversión G → C del nucleótido 116 en el codon 39 del exón 4 del gen *PFKM*, lo que crea un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción *Nla* IV que reconoce la secuencia 5'-GGN↓NCC-3' (Fig. 20).

Para su análisis (67) se amplificó un fragmento de 95 pb del gen *PFKM*, que contenía la posición nucleotídica diana. Mediante PCR se amplificaron 300 ng de ADN genómico con 30 ciclos compuestos por desnaturalización a 96 °C durante 1 min., hibridación a 55 °C durante 1 min. y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Se realizaron una desnaturalización inicial a 96 °C durante 5 min. y una extensión final durante 10 min. a 72 °C. Cada 100 µL de reacción contenían 2.5 U de *Taq* polimerasa, 1 µM de cada cebador (cebadores 39F y 39R), 200 µM de cada dNTP, DMSO 3% y MgCl₂ 1,5 mM en el tampón suministrado. Tras la amplificación, alrededor de 10 µL del producto de PCR se digirieron con 30 U de *Nla* IV en un volumen final de 40 µL durante 3 horas a 37 °C. La detección de los fragmentos se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 4 %.

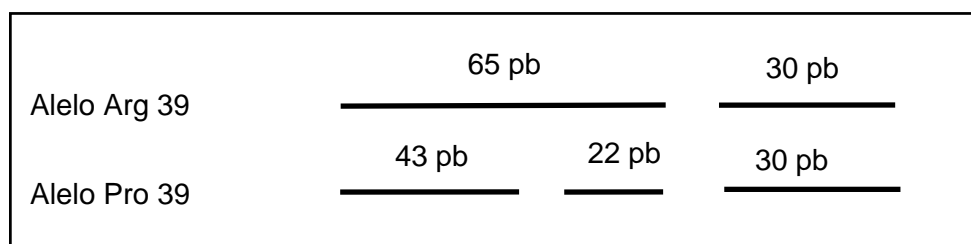


Figura 20. Fragmentos de restricción obtenidos con *Nla* IV en el análisis de la mutación R39P del gen *PFKM*.

8. Análisis de restricción de la mutación Q12X en el gen *AMPD1*

La numeración nucleotídica del gen *AMPD1* comienza con el número uno en la primera base del codon de inicio de la traducción, que a su vez se le ha asignado el número uno en la numeración de tripletes y aminoácidos.

Esta mutación consiste en la transición C → T en el nucleótido 34 en el codon 12 del exón 2 del gen *AMPD1*. Para su estudio se ha utilizado la técnica PCR-PIRA ("primer

introduced restriction analysis”) (141). En este caso se ha utilizado el cebador modificado A12F que produce un lugar de restricción para la enzima *BsaA* I, que reconoce la secuencia 5'-YAC↓GTR-3' en presencia de un alelo normal (Fig. 21).



Figura 21. Utilización del primer modificado A12F para el análisis mediante PCR-PIRA de la mutación Q12X en el gen *AMPD1*.

Para su análisis se amplificó un fragmento de 127 pb del gen *AMPD1*, que contenía la posición nucleotídica diana. Mediante PCR se amplificaron 300 ng de ADN genómico con 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min., hibridación a 58 °C durante 1 min. y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min. y una extensión final durante 10 min. a 72 °C. Cada 100 µL de reacción contenían 2.5 U de *Taq* polimerasa, 1 µM de cada cebador (cebadores A12F y A12R), 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM en el tampón suministrado. Tras la amplificación, alrededor de 10 µL del producto de PCR se digirieron con 30 U de *BsaA* I, en un volumen final de 40 µL durante 3 horas a 37 °C. La detección de los fragmentos se realizó en una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3% (Fig. 22).

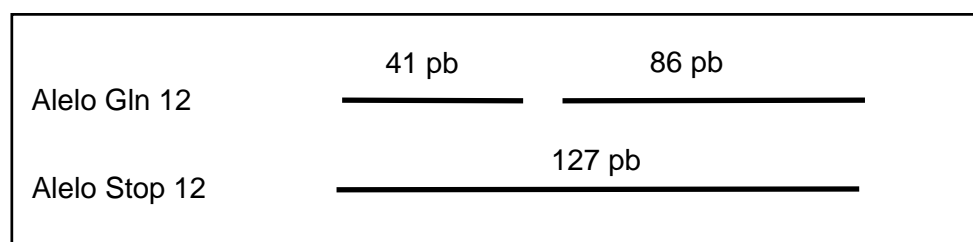


Figura 22. Fragmentos de restricción obtenidos con *BsaA* I en el análisis de la mutación Q12X del gen *AMPD1*.

9. Cribado de mutaciones en el gen *CPT2*.

Se han analizado cuatro mutaciones descritas en el gen *CPT2*, mediante PCR-RFLP. La numeración de nucleótidos de este gen comienza con el número uno en la primera base de la región 5'-UTR del exón 1, y la numeración de los tripletes codificantes se inicia asignando el número uno a la metionina que comienza la traducción (188).

9.1. Mutación S113L

Esta mutación es debida a una transición C → T del nucleótido 854 en el codon 113 en el exón 3 del gen *CPT2*. Para su estudio se ha utilizado la técnica PCR-PIRA (191), utilizando el cebador modificado 113F que crea un lugar de restricción para la enzima *BstX* I, que reconoce la secuencia 5'-CCAN₅↓NTGG-3', en presencia de un alelo mutado (Fig. 23).



Figura 23. Utilización del primer modificado 113F para el análisis PCR-PIRA de la mutación S113L en el gen *CPT2*.

Para su análisis se amplificó un fragmento del gen *CPT2*, que contenía la posición nucleotídica diana, con un tamaño de 167 pb. Utilizando una PCR se amplificaron 300 ng de ADN genómico con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min., hibridación a 56 °C durante 1 min. y extensión a 72 °C durante 1 min. Se realizaron una desnaturalización inicial a 97 °C durante 4 min. y una extensión final de 10 min. a 72 °C. Cada 100 µL de reacción contenían 2.5 U de *Taq* polimerasa, 1 µM de cada cebador (cebadores 113F y 113R), 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM en el tampón suministrado. Tras la amplificación, alrededor de 10 µL del producto de PCR se digirieron con 30 U de *BstX* I en un volumen final de 40 µL durante 3 horas a 55 °C. La detección de los fragmentos se realizó en una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 3 %. (Fig. 24)

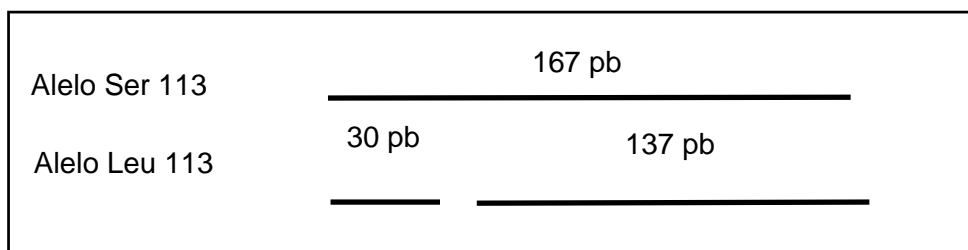


Figura 24. Fragmentos de restricción obtenidos con BstX I en el análisis de la mutación S113L del gen CPT2.

9.2. Mutación P50H

Esta alteración es causada por la transversión C → A de la posición nucleotídica 665 en el codon 50 del exón 1 del gen CPT2. Su detección se ha realizado mediante la técnica PCR-PIRA (188), utilizando el cebador modificado 50R que genera un lugar de restricción para la enzima Dra III que reconoce la secuencia 5'-CACN₃↓GTG-3' en presencia de un alelo mutado (Fig. 25).

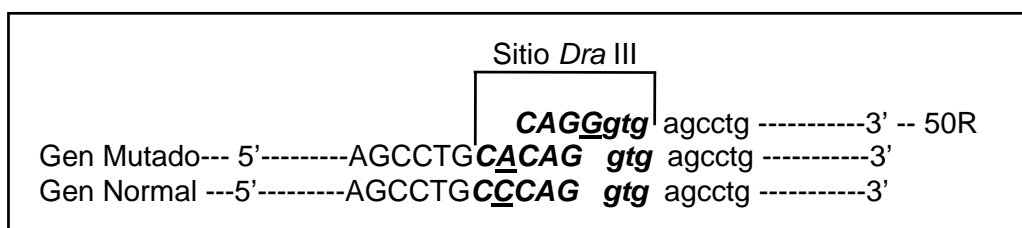


Figura 25. Uso del primer modificado 50R para el análisis mediante PCR-PIRA de la mutación P50H en el gen CPT2.

Para su análisis se amplificó un fragmento de 158 pb del gen CPT2, que contenía la posición nucleotídica diana. Mediante una PCR se amplificaron 500 ng de ADN genómico con 30 ciclos constituidos por desnaturalización a 96 °C durante 1 min., hibridación a 60 °C durante 1 min. y extensión a 72 °C durante 1 min. Se realizaron una desnaturalización inicial a 97 °C durante 4 min. y una extensión final de 10 min. a 72 °C. Cada 100 µL de reacción contenían 2.5 U de Taq polimerasa, 0,5 µM de cada cebador (cebadores 50F y 50R), 200 µM de cada dNTP, DMSO 3% y 1 mM de MgCl₂ en el tampón suministrado. Tras la amplificación, alrededor de 10 µL del producto de PCR se digirieron con 20 U de Dra III, en un volumen final de 40 µL durante 3 horas a 37 °C. La detección de los fragmentos se realizó en una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2,5% (Fig. 26).

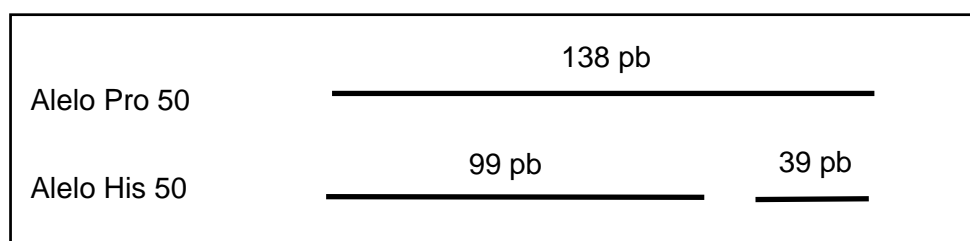


Figura 26. Fragmentos de restricción obtenidos con *Dra* III en el análisis de la mutación P50H del gen *CPT2*.

9.3. Mutaciones Y628S y R631C

La alteración molecular que produce la mutación Y628C consiste en una transversión A → C en la posición nucleotídica 2399 en el codon 628 del exón 5 del gen *CPT2*. La mutación crea un sitio de restricción para la enzima *Mnl* I que reconoce la secuencia 5'-CCTCN_{7/6}↓-3' (198).

La mutación R631C es originada por una transición C → T en el nucleótido 2407 en el codon 631 en el exón 5 del gen *CPT2*. La mutación crea un sitio de restricción para la enzima *Bbv* I que reconoce la secuencia 5'-GCAGCN_{8/12}↓-3' (199).

Para el análisis de ambas mutaciones (198) se amplificó un fragmento de 328 pb, que incluía las posiciones nucleotídicas 2399 y 2407. Mediante PCR se amplificaron 300 ng de ADN genómico con 35 ciclos compuestos por desnaturalización a 95 °C durante 1 min., hibridación a 57 °C durante 1 min. y extensión a 72 °C durante 1 min. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min. y una extensión final de 10 min. a 72 °C. Cada 100 µL de reacción contenían 2.5 U de *Taq* polimerasa, 1 µM de cada cebador (cebadores 628F y 628R), 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM en el tampón suministrado. Tras la amplificación, alrededor de 10 µL del producto de PCR se digirieron, en un volumen final de 40 µL, con 20 U de *Mnl* I en presencia de 100 µg/mL de BSA para analizar la mutación Y628S o con 20 U de *Bbv* I para detectar la mutación R631C, durante 3 horas a 37 °C. El análisis de los fragmentos se realizó en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% o al 3%, respectivamente (Figs. 27 y 28).

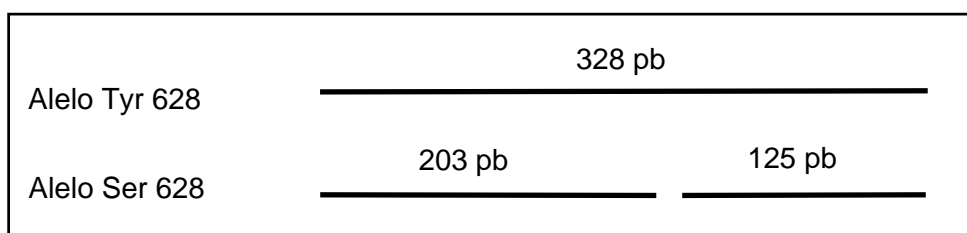


Figura 27. Fragmentos de restricción obtenidos con *Mnl* I en el análisis de la mutación Y628S en el gen *CPT2*.

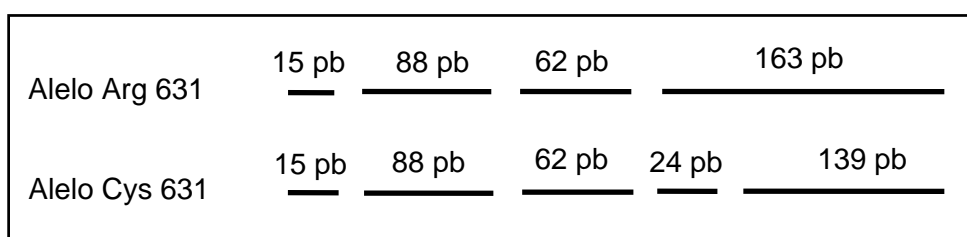


Figura 28. Fragmentos de restricción obtenidos con *Bbv* I en el análisis de la mutación R631C del gen *CPT2*.

10. Caracterización de mutaciones mediante secuenciación directa del gen *PYGM*

Los alelos de los pacientes con déficit de miofosforilasa en los que no se encontraron las mutaciones R49X y G204S fueron sometidos a análisis de secuenciación directa de los exones y zonas adyacentes a las uniones exón / intrón mediante el método descrito por Kubisch y cols. (73), con pequeñas modificaciones.

La metodología aplicada ha consistido en la amplificación por PCR de los 20 exones y de las uniones exón-intrón del gen *PYGM* gracias a la utilización de oligonucleótidos cebadores localizados en zonas intrónicas que flanquean a los exones. La secuencia de ciertos exones fue amplificada dividiéndola en varios fragmentos solapados (etapa de amplificación). Una vez amplificados los distintos fragmentos, éstos fueron purificados (etapa de purificación) y después sometidos a una PCR de secuenciación cíclica ("Cycle sequencing") utilizando didesoxinucleótidos marcados (214) con fluorocromos (216) (etapa de secuenciación). Tras la purificación de los productos de secuenciación, los distintos fragmentos producidos en la reacción de secuenciación se separaron y detectaron mediante electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) (etapa de análisis).

10.1. Etapa de amplificación.

Los oligonucleótidos cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación de los exones del gen *PYGM* se muestran en la tabla VII. Para realizar la PCR, se utilizaron alrededor de 200 ng de ADN que fueron amplificados en 35 ciclos formados por una desnaturalización a 94 °C durante 1 min., una hibridación durante 1 min. (la temperatura para cada fragmento se muestra en la tabla VII) y una extensión a 72 °C durante 1 min. Se realizaron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 min. y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Cada 100 µL de reacción contenía 2,5 U de *Taq* polimerasa (Cultek Inc.), 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador y 1,5 mM de MgCl₂ en el tampón suministrado.

10.2. Etapa de purificación

Los productos de PCR obtenidos en la etapa de amplificación se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve Low Melting Agarose, FMC Products), y el fragmento de interés se purificó con el sistema "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham-Pharmacia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado se determinó espectrofotométricamente la concentración de ADN.

10.3. Etapa de secuenciación.

Se utilizó una alícuota de los productos de PCR purificados para la reacción de secuenciación ("cycle-sequencing PCR") con el sistema "Dye Rhodamine Terminator Cycle Sequencing" (Perkin Elmer-Applied Biosystems). Dicha reacción se realizó en ambas direcciones, directa ("forward") y reversa ("reverse") utilizando los mismos cebadores que en la etapa de amplificación (tabla VII). Para ello, en un volumen final de 10 µL se añadieron entre 150 y 200 ng del producto de PCR purificado, 10% de DMSO, 0,32 µM del cebador correspondiente y 4 µL de "PREMIX" (solución que contiene la ADN polimerasa *Taq* FS de PE-Applied Biosystems, tampón, dNTPs y didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos). El termociclador se programó, en todos los casos, con una desnaturalización a 94 °C durante 3 min. seguida de 25 ciclos compuestos por una desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, una hibridación a 55 °C durante 15 segundos y una extensión a 60 °C durante 4 min.

Tras la reacción de secuenciación se eliminaron los didesoxinucleótidos no incorporados por precipitación con etanol y MgCl₂, de forma que los 10 µL de la reacción se añadieron a 74 µL de precipitante (etanol 70%, MgCl₂ 0,5 mM), dejando la mezcla a

temperatura ambiente durante 15 min. A continuación se centrifugó a 10.000 xg durante 15 min. a 4 °C. Después de eliminar la solución alcohólica, se añadieron 250 µL de etanol al 75% preenfriado, centrifugándose durante 10 minutos a 10.000 xg a 4 °C. Se evaporó el etanol en el termociclador a 45 °C y el residuo seco se almacenó a -20 °C hasta su análisis en el secuenciador automático. El residuo fue reconstituido con 30 µL de TSR ("Template Supression Reagent" - PE-Applied Biosystems), y se dejó a temperatura ambiente 10 min. para hidratarlo. Se agitó en "vortex" y se transfirió la solución a un tubo de secuenciación, que se desnaturalizó en el termociclador durante 3 min. a 95 °C y se mantuvo en hielo hasta su procesamiento en el secuenciador automático. El secuenciador ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer (PE-Applied BioSystems) se programó siguiendo las instrucciones del fabricante. En síntesis su funcionamiento se basa en la separación de los fragmentos mediante una electroforesis capilar, excitación con luz láser de los fluorocromos y análisis de los datos con un programa informático que muestra los resultados en un "electroforegrama" cuyos picos representan la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de ADN procesada.

10.4. Etapa de análisis.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias revisadas del gen *PYGM* depositadas en GenBank (73). La presencia de dos nucleótidos en la misma posición (heterocigosis para una mutación puntual) se puso de manifiesto por la superposición de dos picos en el electroforegrama, hecho que fue comprobado en ambas direcciones de secuenciación. La presencia de microinserciones o microdeleciones en un solo alelo provoca la aparición en el electroforegrama de picos desfasados de un alelo respecto a otro, produciéndose un solapamiento de los mismos, lo que fue comprobado en ambas direcciones.

Si durante el análisis de las secuencias se encontró alguna mutación, el fragmento correspondiente se procesó una vez más (etapas 1 a 4), diseñándose posteriormente un método de PCR-RFLP para confirmar su presencia, cuyo protocolo se expone para cada mutación en particular en la sección de resultados correspondiente.

Tabla VII. *Cebadores utilizados para la amplificación del gen PYGM*

<i>Cebador</i>	<i>Secuencia 5' -3'</i>	<i>Producto de PCR (pb)</i>	<i>Hibridación (°C)</i>
1F 1R	GGC TGG AGG CAG TGC TGA GG gca gcc act taa gtc aag atc g	391	62
2F 4R	tgg gcc tgg ctg agt gtt gg cca gag atg ata aac aag tgg g	598	58
5F 5R	gag ctc ctg act tat act tgg ctc tct gag cct cag cat cc	371	58
6F 7R	taa agc ctt gag tcc cag cc tag ggc acc agc aag tgt cc	457	64
8F 8R	acc cac cgc agc ttt agg cca tgc aga ggc cta gca cac act gtc c	262	67
9F 9R	cat agg gca gtg acc ata gca tgg ctc cca cgc tcc caa act gg	235	64
10F 10R	ggg atg cgt agt gtg tga gg cga ctc cca ggc cca gac tgg	284	68
11F 11R	ttc ctg ggt ctg gtt cta gc ggg ctt ctg tgt gac aga gg	276	64
12F 12R	ccc ttt cag caa gac acc agg gtg aac cac cta cac gac cat acc	289	62
13F 13R	gct tgg ctg acc tgg aaa tgg cac gccc tga ccc aga cat ctg g	264	67
14F 14R	act gga gtg tgg act gta gg aag tcc aaa gga gat gtt gg	312	64
15F 16R	ctc tgt cag gag cta cta cc aag tat ccc agg aag aga cg	482	62
17F 17R	cca gcc taa tct gag agt cc tgg acc agt ctt tcc aga cg	380	62
18F 18R	gac ctg ggt ttt gac cct gg gct tcc cca cca cac acc tga	312	62
19F 20R	cag gct tgg ccc ttg acc tca AGA GAT CTA ACT CCA GTA CC	507	55

Los nombres de los cebadores se corresponden con los exones amplificados (XF = cebador directo, y XR = cebador reverso). pb: pares de bases. El cebador directo y el cebador reverso para una amplificación por PCR se encuentran en un recuadro. Las secuencias están obtenidas a partir de las secuencias depositadas en el GenBank con números de acceso U94774-U94777. En minúsculas los nucleótidos correspondientes a secuencias intrónicas y en mayúsculas los correspondientes a secuencias exónicas.

11. Caracterización de mutaciones mediante secuenciación directa del gen *CPT2*.

Los alelos de los pacientes con déficit bioquímico de CPT II en los que no se encontraron las mutaciones S113L, P50H, R631C o Y628S en el cribado mutacional fueron sometidos a análisis de secuenciación directa de los exones y zonas adyacentes a las uniones intrón-exón del gen *CPT2*, mediante el método descrito por Verdiero y cols.

(188) con ciertas modificaciones. Además, dicha metodología también se aplicó para tipificar los polimorfismos V368I y M637V que pueden estar presentes en los alelos del gen *CPT2* de pacientes con déficit de CPT II.

La metodología aplicada ha consistido en la amplificación por PCR de los exones 1, 2, 3 y 5 del gen *CPT2* usando oligonucleótidos cebadores localizados en regiones intrónicas o zonas UTR que flanquean a éstos. El exón 4 se secuenció en cuatro fragmentos solapados debido a su gran tamaño. La metodología de secuenciación es similar a la utilizada en la caracterización molecular de pacientes con déficit de miofosforilasa (sección número 10) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Cebadores utilizados para la secuenciación del gen *CPT2*.

Cebador	Secuencia 5' -3'	Producto de PCR (pb)	Hibridación (°C)
CPT1F CPT1R	ctt gtg ttt aga ctc cag aac tcc c gtc atg agt gac tgc agt cag gtt	292	57
CPT2F CPT2R	ctt gta aag cta att aac ctc ttc c tca cag aca ttc cct gaa gct tgg t	238	58
CPT3F CPT3R	atg agt tcc tgc cca tga acc taa a cgt tac ttc att tgc tgg tct cac c	305	58
CPT4AF CPT4AR	ggg aca gca tta aca ttt tat gt GTT TGG GTA AAC GAG TTG AGT T	392	55
CPT4BF CPT4BR	CTG GAT ATG TCC CAG TAT TTT CGG CT TTT GTG CCA TCC CCA TGC AGC ATA T	412	60
CPT4CF CPT4CR	GAT GAC TTC CCC CAT TAA GGA CCT T AGG GCT CAG CTT TTG CTT CTT CAG	408	60
CPT4DF CPT4DR	CTG CTA AGG AAA AGT TTG ATG CCA C tgc tta ccc aag cac tga gga caa	418	60
CPT5F CPT5R	ttt cct gag gtc ctt ttc cat cct g ATG AGG AAG TGA TGG TAG CTT TTC A	425	58

Los nombres de los cebadores se corresponden con los exones amplificados (CPTXF = cebador directo, y CPTXR = cebador reverso). pb: pares de bases. El exón 4 se amplificó en cuatro fragmentos solapados. El cebador directo y el cebador reverso para una amplificación por PCR se encuentran en un mismo recuadro. Las secuencias están obtenidas de las secuencias del gen *CPT2* depositadas en el GenBank con números de acceso U09642-U09648. En minúsculas los nucleótidos correspondientes a secuencias intrónicas y en mayúsculas los correspondientes a secuencias exónicas.

Para amplificar por PCR los fragmentos que contenían los exones 2, 3 y 5 se utilizaron aproximadamente 200 ng de ADN que fueron amplificados en 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 94 °C durante 1 min., una hibridación a 58 °C durante 1 min. y una extensión a 72 °C durante 1,5 min. Se realizaron una desnaturalización inicial a 97 °C durante 4 min. y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Cada 100 µL de reacción contenían 2,5 U de Taq polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador y MgCl₂ 1,5 mM en el tampón suministrado. El fragmento

que contenía el exón 1 se amplificó de manera similar excepto por la presencia de $MgCl_2$ 1 mM y DMSO 3%, y con el siguiente programa del termociclador: 4 min. a 97 °C seguido de 30 ciclos compuestos por 95 °C - 1 min., 57 °C - 1 min. y 72 °C - 1 min. Los fragmentos que correspondían al desglose del exón 4 (A, B, C y D) se amplificaron en 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 94 °C durante 1 min., una hibridación a 55 °C (fragmento A) o 60 °C (fragmentos B, C y D) durante 1 min. y una extensión a 72 °C durante 1 min. Se realizaron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min. y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Cada 100 μ L de reacción contenían 2,5 U de Taq polimerasa, 200 μ M de cada dNTP, 0,7 μ M de cada cebador y $MgCl_2$ 1,5 mM en el tampón suministrado.

La etapa de análisis se realizó de forma parecida a la del gen *PYGM*, excepto que las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias del gen *CPT2* depositadas en GenBank (188).

12. Evaluación de la potencial patogenicidad de nuevas mutaciones en los genes *PYGM* y *CPT2*.

Si una mutación nueva era detectada durante la secuenciación directa de los genes *PYGM* y *CPT2*, tras su confirmación mediante PCR-RFLP, se procedió a la evaluación de su posible patogenicidad aplicando dos criterios:

- 1) Ausencia de la mutación en la población control. Para ello se realizó una búsqueda de dicha mutación por procedimientos de PCR-RFLP, diseñados específicamente para cada alteración genotípica encontrada (detallados en el capítulo de resultados), en 77 individuos sanos, que fueron admitidos en la sección de donantes de sangre del Hospital "12 de Octubre" de Madrid, ($X \pm SD = 40 \pm 11$ años, 63% mujeres), y en 23 sujetos con enfermedades mitocondriales ($X \pm SD = 43 \pm 21$ años, 41% mujeres) con mutaciones en el ADN mitocondrial demostradas: 8 pacientes con MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica, y episodios *stroke-like*) con la mutación A3243G; 8 pacientes con LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber), cuatro con la mutación G11778A, dos con la mutación G3460A y dos con la mutación T14484C; 6 pacientes con MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojo rasgadas) con

la mutación A8344G; y 1 paciente con MILS (síndrome de Leigh de herencia materna) con la mutación T8993G.

- 2) Análisis de las posibles consecuencias de la mutación. En las mutaciones “sin sentido” y en las mutaciones “fuera de fase” se evaluó el tamaño y las consecuencias fisiopatológicas de la proteína resultante de la mutación. En las mutaciones “de sentido equivocado” y en las mutaciones “en fase” se consideró el grado de conservación del residuo mutado en la escala filogenética y las consecuencias que provocaría la alteración aminoacídica en la distribución de la carga de la proteína y en la conformación de la misma.

13. Análisis bioestadístico.

Las pruebas bioestadísticas aplicadas para la obtención de algunos de los resultados de esta tesis se han realizado mediante el uso del paquete informático estadístico RSIGMA (216).

RESULTADOS

1. Deficiencia de miofosforilasa

1.1. Análisis bioquímico

1.1.1. Variabilidad y valores de referencia.

Los resultados de la variabilidad analítica y biológica se muestran en la tabla IX.

Tabla IX. Estudio de variabilidad del método de determinación de actividad de miofosforilasa

	<i>Imprecisión intradía</i>		<i>Imprecisión intraindividual</i>	
N	10	10	10	10
X	17,9	11,1	14,4	7,6
SD	1,04	0,75	1,29	0,69
CV (%)	5,9	6,8	9,0	9,1

N: número de determinaciones; X: media aritmética, SD: desviación estándar;
CV: coeficiente de variación

Se han utilizado 30 individuos control para la obtención de valores de referencia de miofosforilasa. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla X.

Tabla X. Valores de referencia de miofosforilasa en tejido muscular

Individuos	30
Edad (X± SD)	25 ± 8
miofosforilasa ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g tejido}^{-1}$)	
X	23,5
SD	4,07
P _{97,5}	32,6
P ₅₀	24,7
P _{2,5}	17,3

X: media; SD: desviación estándar, P: percentil

Teniendo en cuenta la variabilidad biológica y el percentil 2,5 de los valores de referencia, se ha obtenido 15,6 como valor de decisión diagnóstico de déficit de miofosforilasa.

1.1.2. Caracterización bioquímica

Se ha determinado la actividad miofosforilasa muscular a un total de 29 individuos pertenecientes a 27 familias (los pacientes 27 y 28, y, 34 y 35 son hermanos, tabla XI) con indicación clínica e histológica de padecer una deficiencia de miofosforilasa, siguiendo la estrategia diagnóstica planteada en métodos (Fig. 13). Todos ellos presentaron ausencia de tinción para la reacción histoquímica de MPL, y en su totalidad la actividad MPL fue indetectable o menor de $1 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g tejido}^{-1}$.

Las principales hallazgos clínicos, de laboratorio clínico e histológicos de estos 29 pacientes, así como su actividad miofosforilasa, son mostrados en la tabla XI.

1.2. Caracterización genético-molecular

1.2.1. Análisis de PCR-RFLP

En 38 pacientes, 29 con déficit bioquímico de miofosforilasa, y 9 casos adicionales en los que no se practicó biopsia muscular obteniéndose ADN directamente de muestras sanguíneas para análisis molecular (Fig. 13), se estudiaron tanto la mutación común R49X del exón 1 del gen *PYGM*, como la segunda mutación más frecuente en pacientes caucásicos, la G204S (exón 5). La inclusión de los pacientes 7, 14, 18 y 20, y de los pacientes 8 y 21 por ser hermanos de los pacientes 7 y 20 respectivamente (tabla XI), fue debida al conocimiento de ciertos datos clínicos relevantes y, especialmente, pruebas de laboratorio, tales como una curva plana de lactato en isquemia y una actividad elevada de CK sérica en reposo, que sugieren con gran probabilidad la presencia de enfermedad de McArdle. El paciente 23 se incluyó en el estudio por ser hermano sintomático del paciente 22 con déficit bioquímico de MPL. Los individuos 10 y 17 formaron parte de la serie porque aún siendo hermanos asintomáticos de los pacientes 9 y 18 respectivamente, presentaron una curva de lactato en isquemia plana y una CK en reposo elevada. En resumen, se han analizado 38 pacientes pertenecientes a 31 familias diferentes.

La mutación R49X se encontró presente en los dos alelos (homocigosis) de 14 pacientes (37 % del total de pacientes analizados), y en un único alelo (heterocigosis) en otros 15, es decir se detectaron 43 alelos con esta mutación, lo que representa el 56% de los alelos estudiados (Fig. 29).

Un único paciente resultó homocigoto para la mutación G204S (3%). Se demostró la existencia de tres pacientes heterocigotos "compuestos" para las mutaciones R49X y G204S. Así, el alelo Ser-204 se encontró con una frecuencia del 6,6%.

8 casos no presentaron ninguna de estas dos mutaciones.

El empleo de estas dos mutaciones como método de cribado molecular ha permitido caracterizar molecularmente de forma definitiva a 18 pacientes, es decir, cerca de la mitad de los mismos (47%). Además, se ha conseguido detectar al menos un alelo mutado en 30 casos (79%).

En la Fig. 30 se pueden observar ejemplos de los patrones de restricción obtenidos en pacientes con las mutaciones R49X y G204S.

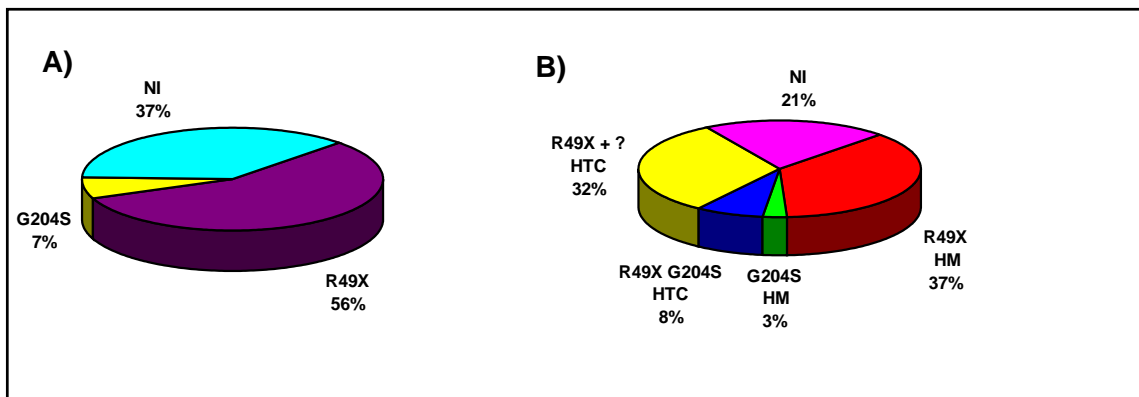


Figura 29. Análisis de cribado molecular utilizando las mutaciones R49X y G204S en 38 pacientes con enfermedad de McArdle. A) distribución alélica, B) distribución porcentual de pacientes.

HT: heterocigoto, HM: homocigoto; HTC: heterocigoto compuesto; NI: no identificado; ?: mutación desconocida.

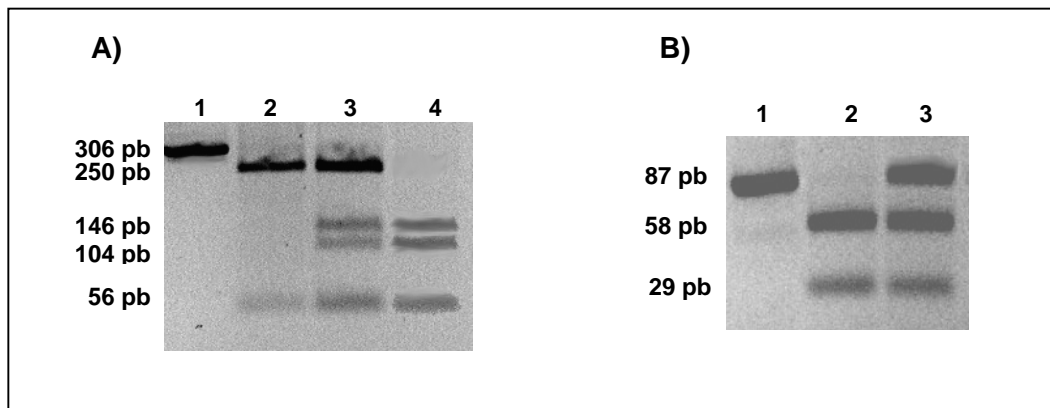


Figura 30. Análisis de las mutaciones R49X (panel A) y G204S (panel B) en el gen PYGM mediante PCR-RFLP.

Panel A: calle 1: producto de PCR, calle 2: control, calle 3: paciente heterocigoto para R49X, calle 4: paciente homocigoto para R49X. Panel B: 1: paciente homocigoto para G204S, calle 2: control, calle 3: paciente heterocigoto para G204S. Ver el apartado métodos para más explicaciones.

Tabla XI. Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con enfermedad de McArdle.

Pacientes	1	2	3	4	5	6
Clínica						
Sexo	V	M	V	V	V	V
Edad de inicio	12	14	51	12	18	8
Edad actual	18	15	53	20	70	25
CK en reposo	NR	NR	500	1000	900	2.200
Curva isquémica de lactato	NR	NR	NR	Plana	NR	Plana
Mioglobinuria	SI	NO	SI	SI	NO	SI
Histología						
PAS	+	NR	+	+	+	NR
Histoquímica MPL	A	A	A	A	A	A
Análisis Bioquímico						
Actividad MPL	0.4	ND	ND	ND	ND	0.3
Análisis molecular						
R49X	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
G204S	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Otras mutaciones						
Q12X-AMPD1	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/+

V: varón; M: mujer; PAS: Acido peryódico de Schiff, histoquímica para glucógeno; MPL: miofosforilasa; ND: indetectable; A: ausencia de tinción en la reacción histoquímica de MPL. Q12X-AMPD1: mutación Q12X en el gen para mioadenilato desaminasa; NR: no realizado; S: muestra de sangre; +/+ : mutación presente en ambos alelos; -/-: mutación ausente; +/-: mutación presente en un único alelo.

Tabla XI (Cont). Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con enfermedad de McArdle.

Pacientes	7	8	9	10	11	12
<i>Clínica</i>						
Sexo	M	V	V	M	V	V
Edad de inicio	14	19	14	AS	6	18
Edad actual	16	21	17	6	13	39
CK en reposo	1700	NR	1150	300	1440	1800
Curva isquémica de lactato	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	NR
Mioglobinuria	NO	NO	SI	NO	NO	SI
<i>Histología</i>						
PAS	S	S	+	S	+	+
Histoquímica MPL	S	S	A	S	A	A
<i>Análisis Bioquímico</i>						
Actividad MPL	S	S	ND	S	ND	ND
<i>Análisis molecular</i>						
R49X	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
G204S	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Otras mutaciones						
Q12X-AMPD1	-/-	-/-	+/-	-/-	+/+	-/-

V: varón; M: mujer; PAS: Acido peryódico de Schiff, histoquímica para glucógeno; MPL: miofosforilasa; ND: indetectable; A: ausencia de tinción en la reacción histoquímica de MPL; Q12X-AMPD1: mutación Q12X en el gen para mioadenilato desaminasa; AS: asintomático; NR: no realizado; S: muestra de sangre; +/+ : mutación presente en ambos alelos; -/-: mutación ausente; +/-: mutación presente en un único alelo.

Tabla XI (Cont.). Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con enfermedad de McArdle.

Pacientes	13	14	15	16	17	18
<i>Clínica</i>						
Sexo	M	V	V	V	V	M
Edad de inicio	50	46	22	10	AS	27
Edad actual	54	59	23	20	10	30
CK en reposo	700	400	1800	1500	300	600
Curva isquémica de lactato	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana
Mioglobinuria	NO	SI	SI	SI	NO	SI
<i>Histología</i>						
PAS	+	S	+	+	S	S
Histoquímica MPL	A	S	A	A	S	S
<i>Análisis Bioquímico</i>						
Actividad MPL	ND	S	ND	ND	S	S
<i>Análisis molecular</i>						
R49X	+/+	+/+	-/-	+/-	+/-	+/-
G204S	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+
Otras mutaciones						
Q12X-AMPD1	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-

V: varón; M: mujer; PAS: Acido peryódico de Schiff, histoquímica para glucógeno; MPL: miofosforilasa; ND: indetectable; A: ausencia de tinción en la reacción histoquímica de MPL ; Q12X-AMPD1: mutación Q12X en el gen para mioadenilato desaminasa; AS: asintomático; NR: no realizado; S: muestra de sangre; +/+ : mutación presente en ambos alelos; -/-: mutación ausente; +/-: mutación presente en un único alelo.

Tabla XI (Cont.). Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con enfermedad de McArdle.

Pacientes	19	20	21	22	23	24
<i>Clínica</i>						
Sexo	V	V	V	M	V	M
Edad de inicio	37	10	18	20	17	10
Edad actual	38	17	34	38	28	29
CK en reposo	1200	900	NR	1800	1350	1400
Curva isquémica de lactato	NR	Plana	NR	Plana	Plana	Plana
Mioglobinuria	SI	SI	NO	NO	NO	SI
<i>Histología</i>						
PAS	+	S	S	+	S	NR
Histoquímica	A	S	S	A	S	A
<i>Análisis Bioquímico</i>						
Actividad MPL	0,4	S	S	ND	S	ND
<i>Análisis molecular</i>						
R49X	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
G204S	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Otras mutaciones	W797R +/+	W797R -/+	W797R -/+	T487N -/+	T487N -/+	A703V -/+
Q12X-AMPD1	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
<p>V: varón; M: mujer; PAS: Acido peryódico de Schiff, histoquímica para glucógeno; MPL: miofosforilasa; ND: indetectable; A: ausencia de tinción en la reacción histoquímica de MPL ; Q12X-AMPD1: mutación Q12X en el gen para mioadenilato desaminasa; NR: no realizado; S: muestra de sangre; +/+ : mutación presente en ambos alelos; -/-: mutación ausente; +/-: mutación presente en un único alelo.</p>						

Tabla XI (Cont.). Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con enfermedad de McArdle.

Pacientes	25	26	27	28	29	30
<i>Clínica</i>						
Sexo	V	V	V	M	M	M
Edad de inicio	16	12	16	18	22	42
Edad actual	22	18	49	30	22	44
CK en reposo	700	2000	1200	900	700	600
Curva isquémica de lactato	NR	Plana	Plana	Plana	Plana	NR
Mioglobinuria	SI	SI	SI	NO	SI	NO
<i>Histología</i>						
PAS	+	+	+	+	NR	+
Histoquímica MPL	A	A	A	A	A	A
<i>Análisis Bioquímico</i>						
Actividad MPL	0,3	0,4	ND	ND	ND	ND
<i>Análisis molecular</i>						
R49X	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-
G204S	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Otras mutaciones	A659D +/+	R193W 794/795 delAA +/+	533delA -/+	533delA -/+	R601W -/+	Q754X -/+
Q12X-AMPD1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<p>V: varón; M: mujer; PAS: Acido peryódico de Schiff, histoquímica para glucógeno; MPL: miofosforilasa; ND: indetectable; A: ausencia de tinción en la reacción histoquímica de MPL ; Q12X-AMPD1: mutación Q12X en el gen para mioadenilato desaminasa; NR: no realizado; +/+ : mutación presente en ambos alelos; -/-: mutación ausente; +/-: mutación presente en un único alelo.</p>						

Tabla XI (Cont.). Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con enfermedad de McArdle.

Pacientes	31	32	33	34	35	36
<i>Clínica</i>						
Sexo	M	M	V	M	V	M
Edad de inicio	15	55	18	14	18	10
Edad actual	16	60	20	21	19	56
CK en reposo	500	700	3000	1000	800	1100
Curva isquémica de lactato	Plana	NR	NR	Plana	Plana	Plana
Mioglobinuria	NO	NO	SI	NO	SI	NO
<i>Histología</i>						
PAS	+	NR	NR	NR	NR	NR
Histoquímica MPL	A	A	A	A	A	A
<i>Análisis Bioquímico</i>						
Actividad MPL	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Análisis molecular</i>						
R49X	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-
G204S	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Otras mutaciones	5'ivs14 +/+	E348K -/+	753delA -/+	753delA -/+	753delA -/+	R323G -/+
				387 i/d* -/+	387 i/d* -/+	
Q12X-AMPD1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

V: varón; M: mujer; PAS: Acido peryódico de Schiff, histoquímica para glucógeno; MPL: miofosforilasa; ND: indetectable; A: ausencia de tinción en la reacción histoquímica de MPL ; Q12X-AMPD1: mutación Q12X en el gen para mioadenilato desaminasa; NR: no realizado; +/+ : mutación presente en ambos alelos; -/-: mutación ausente; +/-: mutación presente en un único alelo. * 387 i/d: mutación 387 insA/del 8 pb.

Tabla XI (Cont.). Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con enfermedad de McArdle.

Pacientes	37	38
<i>Clínica</i>		
Sexo	V	V
Edad de inicio	49	52
Edad actual	59	52
CK en reposo	2000	1700
Curva isquémica de lactato	NR	NR
Mioglobinuria	NO	SI
<i>Histología</i>		
PAS	NR	+
Histoquímica MPL	A	A
<i>Análisis Bioquímico</i>		
Actividad MPL	ND	ND
<i>Análisis molecular</i>		
R49X	-/-	-/-
G204S	-/-	-/-
Otras mutaciones	W797R +/+	E124X +/+
Q12X-AMPD1	-/-	-/-
<p>V: varón; M: mujer; PAS: Acido peryódico de Schiff, histoquímica para glucógeno; MPL: miofosforilasa; ND: indetectable; A: ausencia de tinción en la reacción histoquímica de MPL ; Q12X-AMPD1: mutación Q12X en el gen para mioadenilato desaminasa; NR: no realizado; +/+ : mutación presente en ambos alelos; -/-: mutación ausente; +/-: mutación presente en un único alelo.</p>		

1.2.2. Análisis de secuenciación

Los 20 pacientes con enfermedad de McArdle que no pudieron ser caracterizados molecularmente de forma definitiva mediante el análisis de las mutaciones R49X y G204S fueron sometidos a análisis de secuenciación directa del gen *PYGM*. En 12 pacientes que resultaron heterocigotos para la mutación R49X se buscó la mutación en el otro alelo y en los 8 pacientes restantes se trató de identificar la mutación en ambos alelos. Así se secuenciaron 28 alelos, en los que se demostró la presencia de las mutaciones que se describen a continuación.

1.2.2.1. Mutaciones conocidas

Se encontraron dos mutaciones conocidas mediante análisis de secuenciación. En el paciente 31 se ha observado la mutación 5' *ivs14* g→a (primer nucleótido del intrón 14) en sus dos alelos, descrita por Tsujino y cols (67) y posteriormene encontrada por Bruno y cols. (71) en otra familia. El caso 33, heterocigoto para la mutación R49X, presentó en el exón 18 de su otro alelo la mutación 753 delA, descrita por Kubisch y cols. (73). Dicha mutación además la presentaron dos hermanos, pacientes 34 y 35, en heterocigosis (Fig. 31).

1.2.2.2. Nuevas mutaciones

Se han encontrado 13 nuevas mutaciones (Tablas XI y XII): dos microdeleciones (533 delA y 794/795 delAA), una inserción/delección - "indel"- (387 insA/del 8pb), dos mutaciones "sin sentido" (E124X y Q754X) y ocho mutaciones "de sentido equivocado" (R193W, R323G, E348K, T487N, R601W, A659D, A703V y W797R) (Fig. 31).

i) Mutación E124X

En el paciente 38 el análisis de secuenciación reveló una transversión G → T en homocigosis en el exón 3 (Fig. 32) que implica la sustitución de un triplete que codifica glutamato (GAA) por un codon de parada de lectura (TAA) en la posición 124 (E124X), lo que conduce a la síntesis de una proteína de un tamaño muy reducido. Dicha mutación se confirmó mediante un método PCR-PIRA utilizando el cebador modificado denominado 124F (5'-TCA CTC CTC CAG CTG GGC CTG GAC ATG GAG GAG CCT GA-3') y el oligonucleótido 4R, amplificando un fragmento de 355 pb que al ser digerido con el enzima de restricción *Sau* I (5'-CC[↓]TNAGG-3') genera dos fragmentos de 320 y 35 pb cuando existe un alelo normal Glu-124, permaneciendo como tal en presencia de un alelo mutado Stop-124 (Fig. 32).

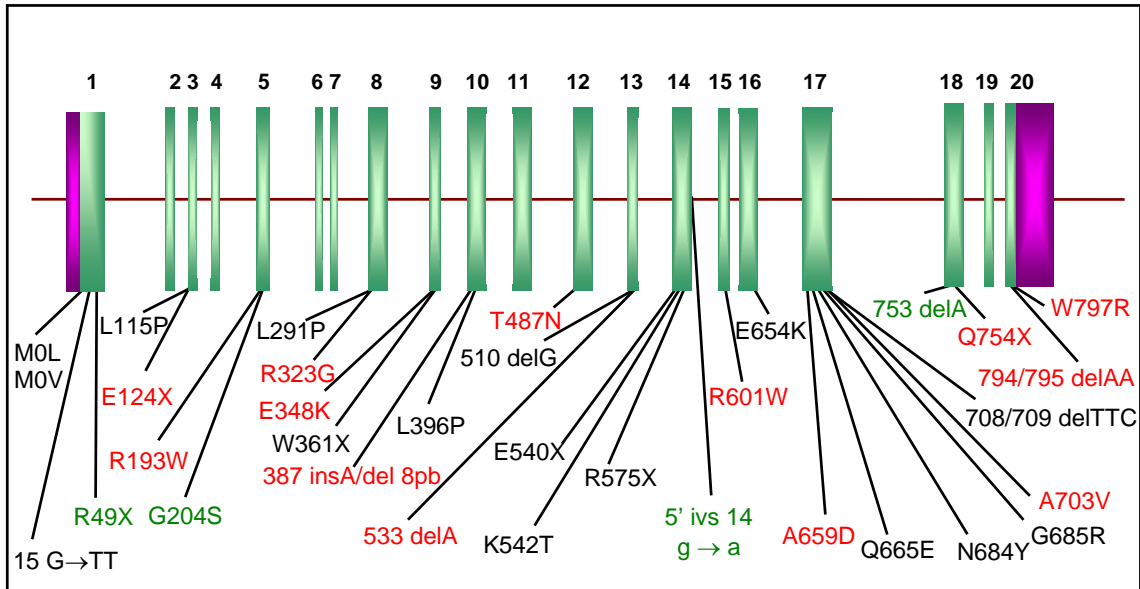


Figura 31. Localización de las mutaciones en el gen PYGM asociadas con enfermedad de McArdle.

En rojo se indican las nuevas mutaciones observadas durante esta tesis. En verde se representan las mutaciones encontradas en esta tesis previamente descritas. Los rectángulos representan a los exones. Las zonas de color rosa indican las regiones no traducibles. ivs: intrón; del: delección; ins: inserción.

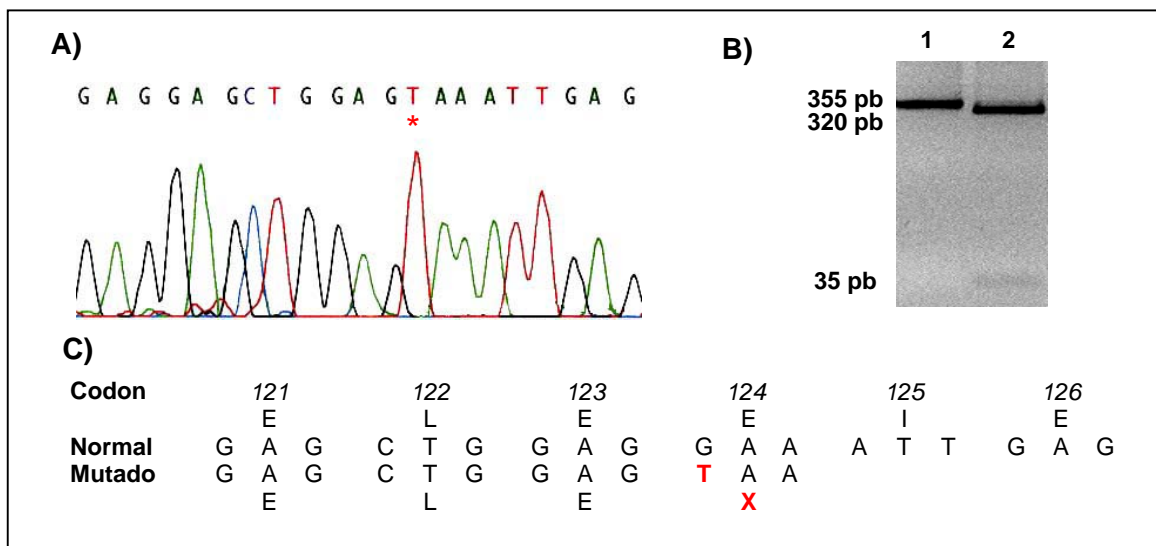


Figura 32. Mutación E124X en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución G→T en el codón 124 es indicada por un asterisco. B) PCR-PIRA con *Sau I* en gel de agarosa al 3% (ver explicaciones en el texto); calle 1: paciente 38, homocigoto para E124X, calle 2: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados son destacados en color rojo.

ii) Alelo mutado R193W -794/795 delAA

En el paciente 26 se descubrieron dos mutaciones, ambas en homocigosis. Una de ellas consiste en una transición C → T en el exón 5 que produce la sustitución de un residuo de arginina (CGG) por uno de triptófano (TGG) en la posición 193 (R193W). La presencia de la mutación se confirmó mediante PCR-RFLP utilizando los cebadores 5F y 5R. El producto amplificado de 371 pb fue digerido con el enzima de restricción *Msp* I (5'-C[↓]CGG-3'), formandose tres fragmentos de 197 pb, 141 pb y 33 pb cuando existe un alelo Arg-193, y únicamente dos fragmentos de 338 pb y 33 pb en presencia del alelo mutado Trp-193 (Fig. 33).

La otra mutación encontrada en el paciente 26 es una microdelección homocigótica de dos nucleótidos de adenina situados en la unión de los codones 794 y 795 (794/795 delAA) pertenecientes al exón 20. Esto produce una mutación “fuera de fase” desplazando la pauta de lectura del código genético, lo cual conduce a la aparición de un nuevo codon de fin de la traducción en el triplete 813. La mutación predice por tanto la síntesis de una proteína truncada de menor tamaño, con 29 aminoácidos menos, en el extremo carboxiterminal (Fig. 34). Esta delección se comprobó mediante análisis de PCR-RFLP, amplificando un fragmento de 507 pb utilizando los cebadores 19F y 20R, que es dividido en dos fragmentos de 342 pb y 165 pb en presencia de un alelo normal cuando se trata con el enzima de restricción *Ava* I (5'-C[↓]YCGRG-3'). La delección crea un nuevo sitio de restricción para *Ava* I, de forma que el fragmento de 342 pb es digerido por el enzima en dos productos de 262 pb y 78 pb (este fragmento es 2 pb más corto debido a la delección) cuando existe un alelo deleccionado (Fig. 34).

iii) Mutación R323G

En el paciente 36, heterocigoto para la mutación R49X, se observó en el otro alelo una transversión C → G en el exón 8 que provoca la sustitución de arginina (CGC) por glicina (GGC) en el codon 323. La presencia de la mutación se comprobó mediante análisis de PCR-RFLP utilizando los cebadores 8F y 8R para amplificar un fragmento de 262 pb que en presencia del alelo normal Arg-323 es digerido con el enzima de restricción *Hha* I (5'-GCG[↓]C-3') en dos de 180 pb y 82 pb, permaneciendo inalterado si existe el alelo mutado Gly-323 (Fig. 35).

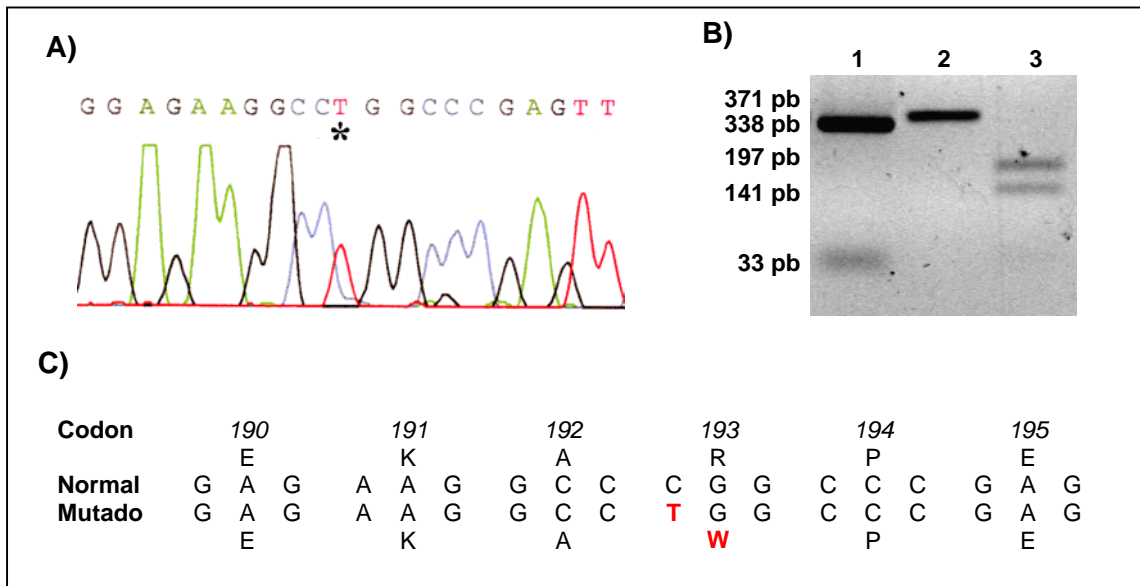


Figura 33. Mutación R193W en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución C→T en el codón 193 es indicada por un asterisco. B) PCR-RFLP con *Msp* I en gel de agarosa al 2% (ver explicaciones en el texto); calle 1: paciente 26, homocigoto para R193W, calle 2: producto de PCR sin digerir, calle 3: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

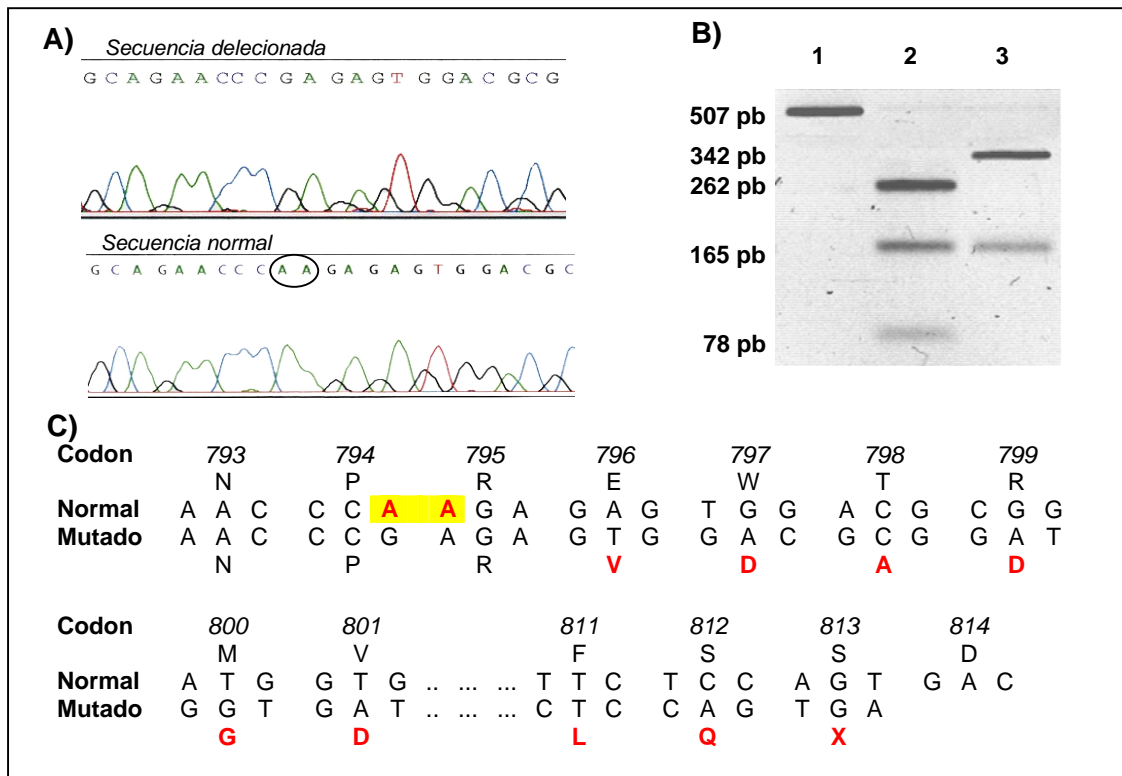


Figura 34. Mutación 794/795 delAA en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde se puede observar la secuencia del exón 20 con la delección del par de adeninas vs la secuencia del mismo fragmento en un sujeto control (la delección de dos adeninas se reseña en el círculo) B) PCR-RFLP con *Ava* I en gel de agarosa al 1,5 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calle 2: paciente 26, homocigoto para la microdelección, calle 3: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. La delección conduce a un desplazamiento de la pauta de lectura del código genético cuyo resultado es la aparición de un codón de terminación en el triplete 813.

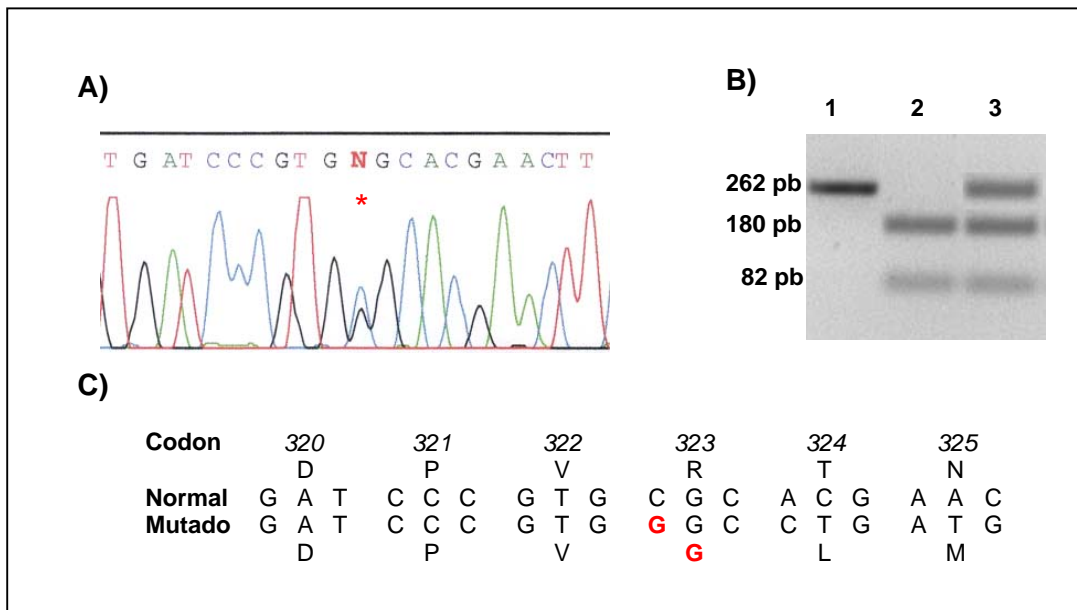


Figura 35. Mutación R323G en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución C→G en el codon 323 es indicada por un asterisco. B) PCR-RFLP con *Hha* I en gel de agarosa al 2% (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calle 2: control, calle 3: paciente 36, heterocigoto para R323G. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

iv) Mutación E348K

El paciente 32, heterocigoto para la mutación R49X, presentó una transversión G→A heterocigota en el exón 9 (Fig. 36), que conduce a la sustitución de glutamato (GAG) por lisina (AAG) en el codon 348. La mutación se comprobó mediante análisis de PCR-RFLP utilizando los cebadores 9F y 9R con los que se amplificó un fragmento de 292 pb que en presencia del alelo normal Glu-348 es digerido con el enzima de restricción *Ava* I en tres fragmentos de 158 pb, 92 pb y 42 pb. En presencia del alelo mutado Lys-348 se destruye un sitio de restricción para *Ava* I, obteniéndose dos fragmentos de 250 pb y 42 pb (Fig. 36).

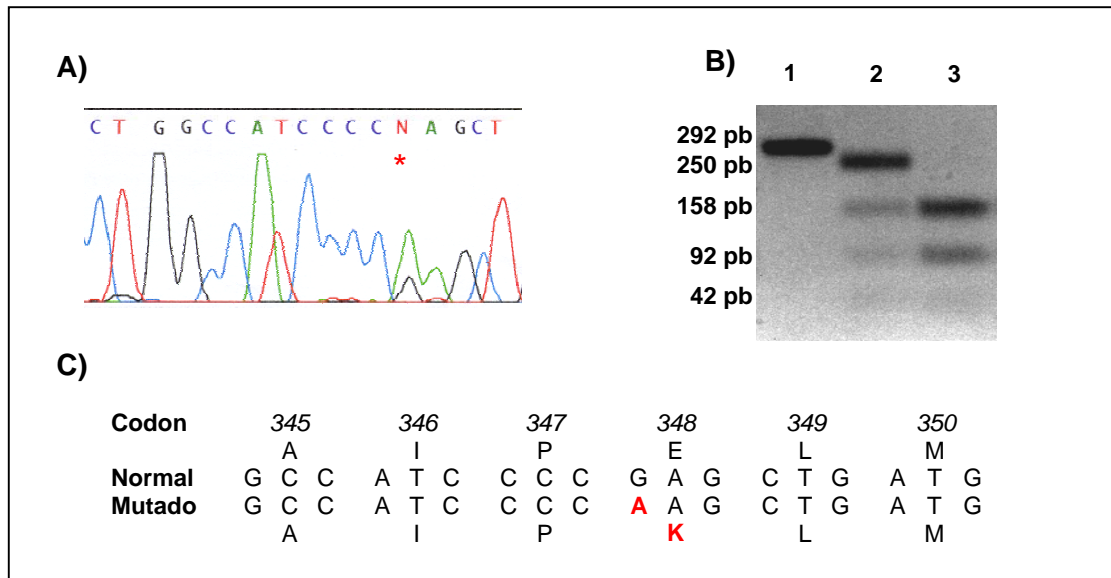


Figura 36. Mutación E348K en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución G→A en el codon 348 es indicada por un asterisco. B) PCR-RFLP con *Ava* I en gel de agarosa al 2% (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calle 2: paciente 32, heterocigoto para E348K, calle 3: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

v) *Mutación 387 insA/del 8 pb*

En los pacientes 34 y 35, que son hermanos, se identificó la mutación 753delA en uno de sus alelos, y en el otro se observó una mutación compleja en el exón 10, que consiste en la inserción de una adenina antes del comienzo del codon 387 combinada con una deleción de un “elemento simétrico” de 8 pb (5'-TGGCCGGT-3') pertenecientes a los tripletes 387, 388 y 389. La secuenciación del fragmento correspondiente al exón 10 mostró una superposición de picos en el electroforegrama a partir de cierta base tanto en dirección directa como reversa, lo que sugería la existencia de una inserción o deleción en heterocigosis de unos 7-8 pb de bases. Para secuenciar el alelo con dicha alteración molecular se digirió el fragmento con el enzima de restricción *Msp* I (5'-GGCC-3') que cortaría en esos 7-8 pb (es decir, si existiera una deleción de esa secuencia nucleotídica, el enzima únicamente cortaría en el alelo que no llevara la deleción y no lo haría en el alelo problema). Debido a que *Msp* I, contiene además otro sitio de reconocimiento en este fragmento de 284 pb, tras la digestión del mismo se obtendrían tres fragmentos de 143 pb, 81 pb y 60 pb en un alelo no delecionado, mientras que en el mutado se obtendrían únicamente dos fragmentos de aproximadamente de 218 pb y 60 pb (Fig. 37). Así, tras la digestión enzimática se separaron los fragmentos en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2%, pudiéndose aislar, purificar y secuenciar con el cebador 10F el fragmento de aproximadamente 218 pb, obteniendo como resultado la presencia de

una inserción de una adenina combinada con una delección de 8 pb. (Fig. 37). Esta mutación produce un desplazamiento en el código de lectura que conduce a la aparición de un nuevo codon de terminación en la posición 420.

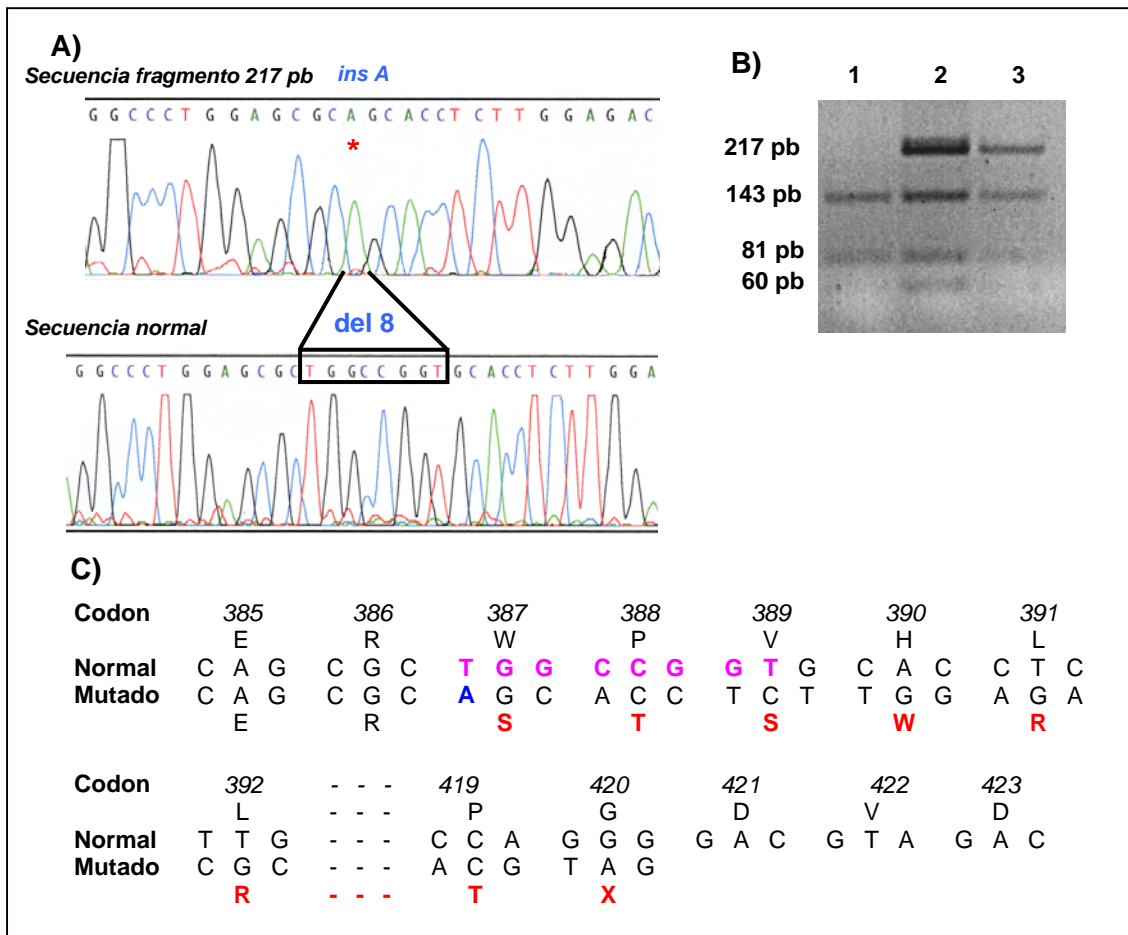


Figura 37. Mutación 387 insA/del 8pb en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde se puede observar la secuencia del exón 10 en el alelo con la inserción de una adenina y la delección del octanucleótido 5'-TGGCCGGT-3' (secuencia del fragmento de 217 pb obtenido tras digestión con *Msp I* vs secuencia del exón 10 perteneciente a un sujeto control). B) PCR-RFLP con *Msp I* en gel de agarosa al 3 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: control, calles 2 y 3: pacientes 34 y 35 respectivamente, ambos heterocigotos para la mutación "indel". C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. La delección conduce a un desplazamiento de la pauta de lectura del código genético cuyo resultado es la aparición de un codon de terminación en el triplete 420. La microdelección en rosa, la microinserción en azul y los residuos aminoacídicos mutados en rojo.

vi) **Mutación T487N**

En los pacientes 22 y 23 que son hermanos heterocigotos para R49X se observó una transversión C → A en el exón 12 del otro alelo (Fig. 38) que conlleva la sustitución de un residuo treonina (ACC) por uno de asparragina (AAC) en el codon 487. La presencia de la mutación se comprobó mediante un método PCR-PIRA utilizando el cebador modificado 487F (5'-TGA GCT GGA GCC TCA TAA GTT CCA GAA TAA GAC

CAA CGG CAT T_A-3') y el cebador 12R, para amplificar un fragmento de 180 pb que es dividido en dos fragmentos de 138 y 32 pb en presencia de el alelo mutado Asn-487 con el enzima de restricción *Mse* I (5'-T[↓]TAA-3'), lo que no ocurre cuando existe el alelo normal Thr-487 (Fig. 38).

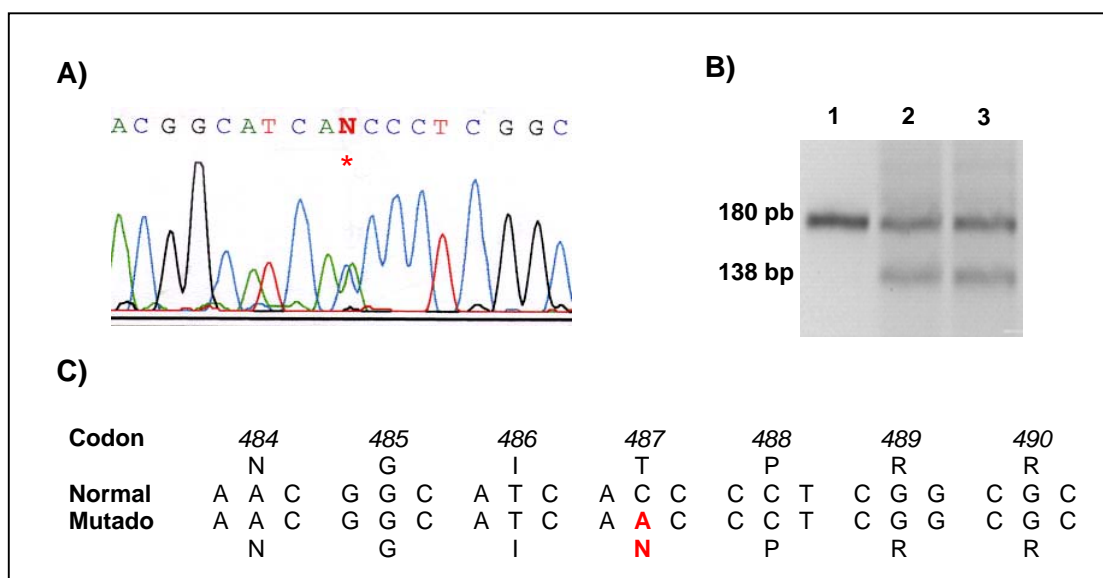


Figura 38. Mutación T487N en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución C→A en el codon 487 es indicada por un asterisco. B) PCR-PIRA con *Mse* I en gel de agarosa al 2,5% (ver explicaciones en el texto); calle 1: control, calles 2 y 3: pacientes 22 y 23 respectivamente, ambos heterocigotos para T487N. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

vii) Mutación 533 delA

En los pacientes 27 y 28, que son hermanos y heterocigotos para la mutación R49X, se encontró en el otro alelo una delección de un nucleótido de adenina perteneciente al codon 533 (533 delA) en el exón 13. Esta alteración conlleva un desplazamiento de la pauta de lectura, activándose un nuevo triplete stop en el codon 537 lo que predice la síntesis de una proteína severamente truncada en 305 aminoácidos del extremo carboxiterminal (Fig. 39). Esta delección se confirmó mediante análisis de PCR-RFLP, amplificando un fragmento de 263 pb utilizando los cebadores 13F y 13R, que se fragmenta en dos de 210 pb y 53 pb en presencia de un alelo normal cuando se trata con el enzima de restricción *Msi* I (5'-CAYNN[↓]NNRTG-3'). La delección crea un nuevo sitio de restricción para *Msi* I, de forma que el fragmento de restricción de 209 pb (fragmento 1 pb más corto debido a la delección) es digerido por el enzima en dos productos de 112 pb y 97 pb en presencia de un alelo delecionado (Fig. 39).

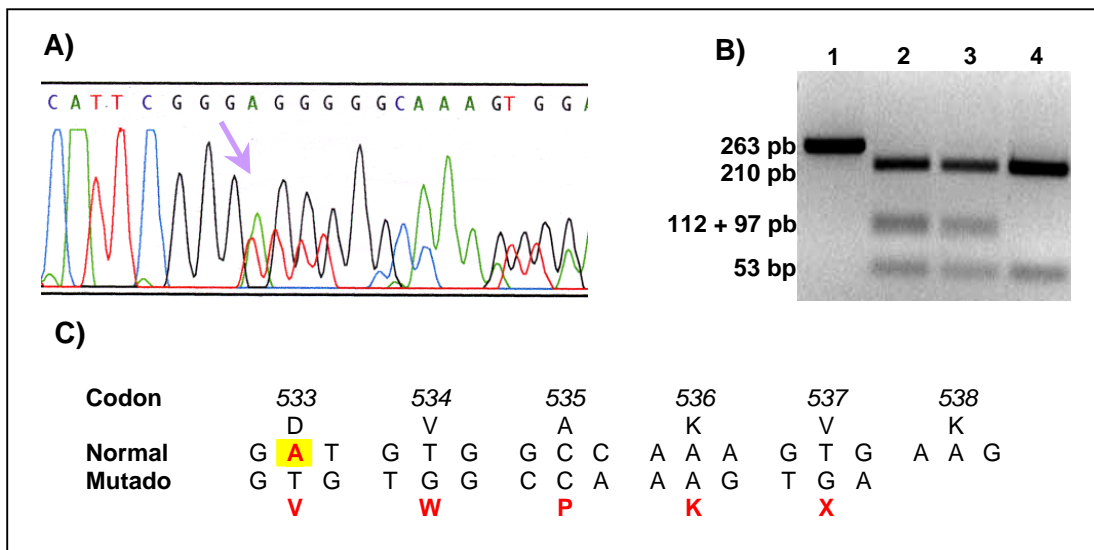


Figura 39. Mutación 533 delA en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa: la flecha indica la posición donde comienza un solapamiento de secuencias. Este hecho sugiere la presencia de una microlesión en heterocigosis, que en este caso es la delección de una adenina. B) PCR-RFLP con *Msp* I en gel de agarosa al 2,5 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calles 2 y 3: pacientes 27 y 28 respectivamente, ambos heterocigotos para 533 delA, calle 4: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. El nucleótido delecionado, adenina, provoca un desplazamiento de la pauta de lectura que conduce a la aparición de un triplete de terminación en el codon 537. Los residuos aminoacídicos mutados en color rojo.

viii) *Mutación R601W*

El paciente 29 resultó heterocigoto compuesto para la mutación R49X y una nueva mutación, R601W, causada por una transición C → T en el exón 15 (Fig. 40) que produce la sustitución de arginina (CGG) por triptófano (TGG) en el codon 601. La presencia de la mutación se confirmó mediante análisis de PCR-RFLP utilizando los cebadores 15F y 16R con los que se amplificó un fragmento de 482 pb que tras tratamiento con el enzima de restricción *Sty* I (5'-C[↓]CWWGG-3') es digerido en dos fragmentos de 418 y 64 pb en presencia del alelo normal Arg-601. Cuando existe el alelo mutante Trp-601 se crea un nuevo sitio de restricción para *Sty* I digiriéndose el fragmento de 418 pb en dos de 320 pb y 98 pb (Fig. 40).

ix) *Mutación A659D*

En el paciente 25 se puso de manifiesto una transversión C → A homocigota en el exón 17 (Fig. 41), que produce la sustitución de un residuo alanina (GCT) por uno de aspartato (GAT) en el codon 659. La presencia de la mutación se comprobó mediante análisis de PCR-RFLP utilizando los cebadores 17F y 17R, con los que se amplificó un fragmento de 380 pb que es digerido con el enzima de restricción *Pst* I (5'-CTGCA[↓]G-3')

en dos fragmentos de 289 y 91 pb en presencia del alelo normal Ala-659, y no es digerido cuando existe el alelo mutante Asp-659 (Fig. 41).

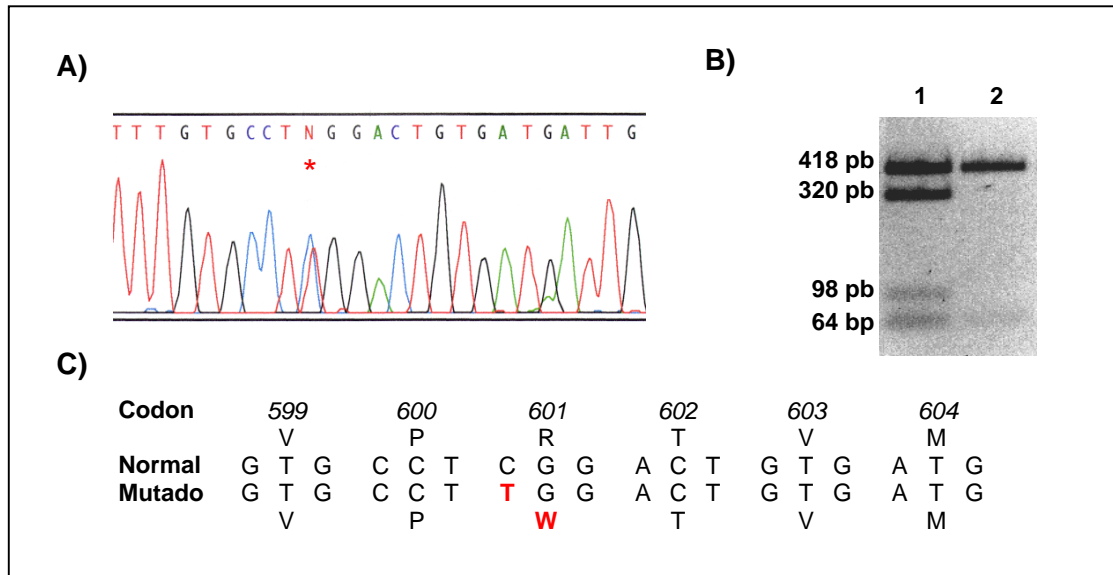


Figura 40. Mutación R601W en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sutitución C→T en el codon 601 es indicada por un asterisco. B) PCR-RFLP con *Sty I* en gel de agarosa al 1.5 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: paciente 29, heterocigoto para R601W, calle 2: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

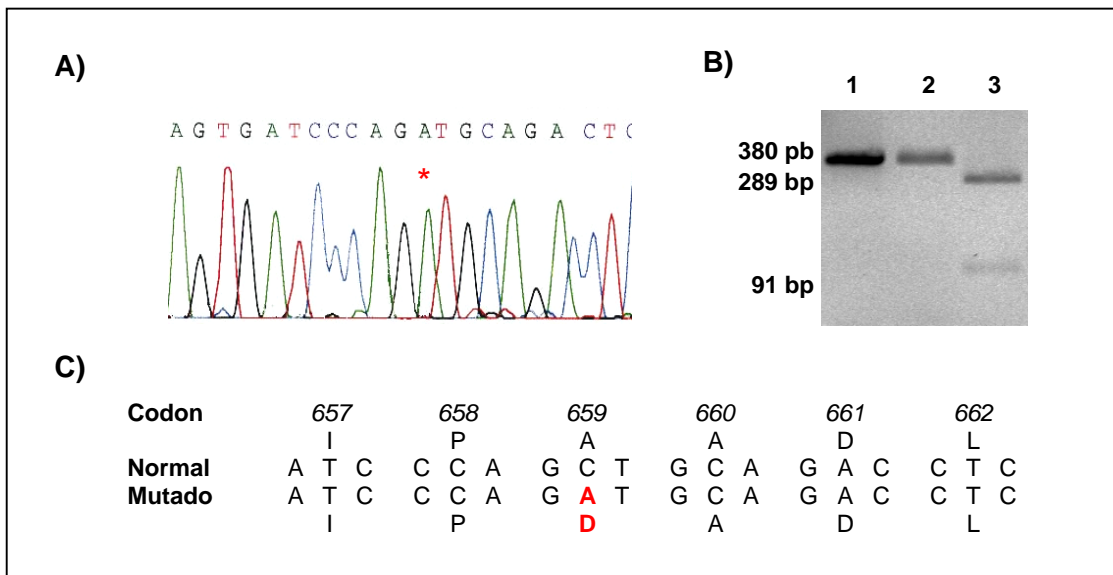


Figura 41. Mutación A659D en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sutitución C→A en el codon 659 es indicada por un asterisco. B) PCR-RFLP con *Pst I* en gel de agarosa al 1.5 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calle 2: paciente 25, homocigoto para A659D, calle 3: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

x) *Mutación A703V*

En el paciente 24, que era heterocigoto para R49X, se observó una transición C→T en el exón 17 del otro alelo (Fig. 42) que produce la sustitución de un residuo alanina (GCG) por uno de valina (GTG) en el codon 703. La presencia de la mutación se comprobó mediante método PCR-PIRA utilizando el cebador 17F y el cebador modificado denominado 703R (5'-CTC CAC CCG CAT GCC AAA GAT GAA GAA GTT TTC CTC TCGC-3'). El fragmento amplificado de 259 pb es digerido con el enzima de restricción *Hha* I (5'-GCG↓C-3') en dos fragmentos de 220 y 39 pb cuando existe un alelo normal Ala-703, permaneciendo como tal en presencia de un alelo mutado Val-703 (Fig. 42).

xi) *Mutación Q754X*

En el paciente 30, que era heterocigoto para R49X, se identificó una transición C→T en el exón 18 del otro alelo (Fig. 43) que produce una mutación "sin sentido" al ser sustituido un triplete que codifica para glutamina (CAG) por un codon stop (TAG) en el codon 754. Esta alteración predice la biosíntesis de una proteína en la que se habrán eliminado 88 aminoácidos de su extremo carboxiterminal. La mutación se comprobó mediante PCR-PIRA utilizando el cebador 18F y el cebador modificado 754R (5'-ATC TTG ACA ATG TCC TTG AAC AGG TCG GGA T-3'). El fragmento amplificado de 219 pb es digerido con el enzima de restricción *Fok* I (5'-GGATGN_{9/13}↓-3') en dos fragmentos de 179 y 40 pb cuando existe un alelo normal Glu-754, permaneciendo como tal en presencia de un alelo mutado Stop-754 (Fig. 43).

xii) *Mutación W797R*

En los pacientes 19 y 37 se puso de manifiesto en homocigosis una transición T→C (Fig. 44) que conlleva la sustitución del aminoácido triptófano (TGG) por un residuo de arginina (CGG) en la posición 797 del exón 20. Dicha mutación también se encontró en forma de heterocigosis "compuesta" en otros dos pacientes, los casos 20 y 21 que eran hermanos y heterocigotos para R49X. La mutación se confirmó mediante análisis PCR-PIRA utilizando el cebador 797F (5'-TTG TAC AAG GTG AGG GGT CCT-3') y el cebador modificado 797R (5'-TTG ACC GAG GTG GCG ATG TTC CTT ATC ACC ATC CGC GTG C-3'), con los que se amplifica un fragmento de 174 pb que es digerido con el enzima de restricción *Hha* I (5'-GCG↓C-3') en dos fragmentos de 135 y 39 pb en presencia del alelo mutado Arg-797 y que permanece intacto cuando el alelo es normal - alelo Trp-797 (Fig. 44).

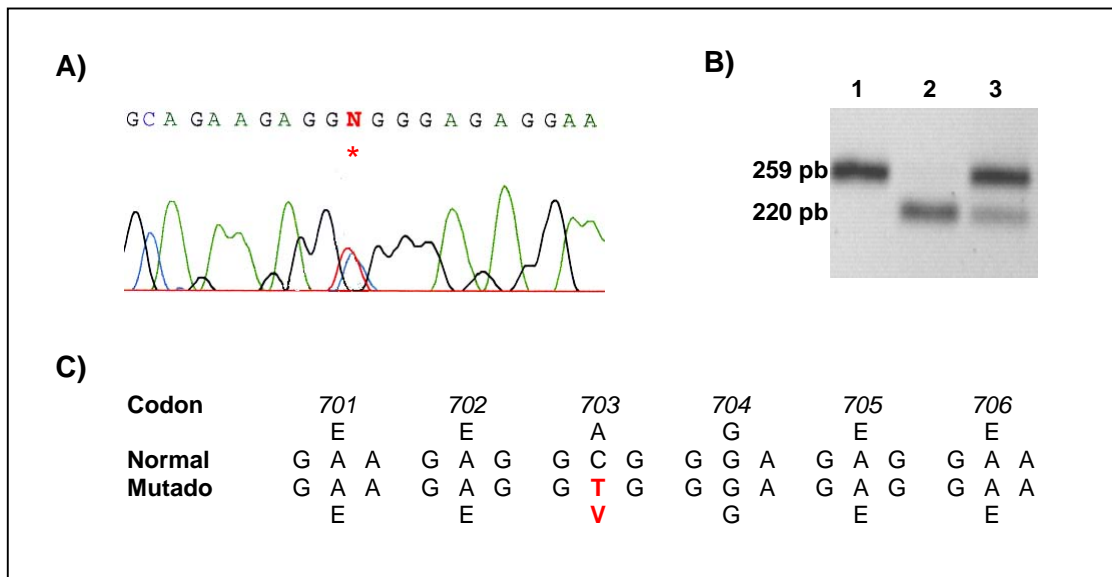


Figura 42. Mutación A703V en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución C→T en el codon 703 es indicada por un asterisco. B) PCR-PIRA con *Hha* I en gel de agarosa al 2,5 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calle 2: control, calle 3: paciente 24, heterocigoto para A703V. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

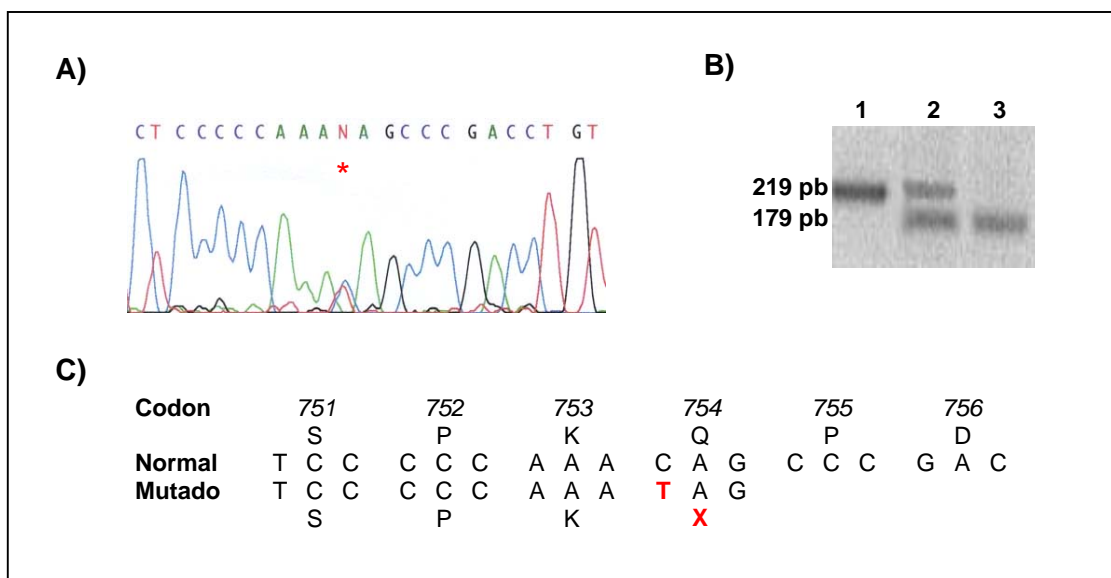


Figura 43. Mutación Q754X en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución C→T en el codon 754 es indicada por un asterisco. B) PCR-PIRA con *Fok* I en gel de agarosa al 2,5 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calle 2: paciente 30, heterocigoto para Q754X, calle 3: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

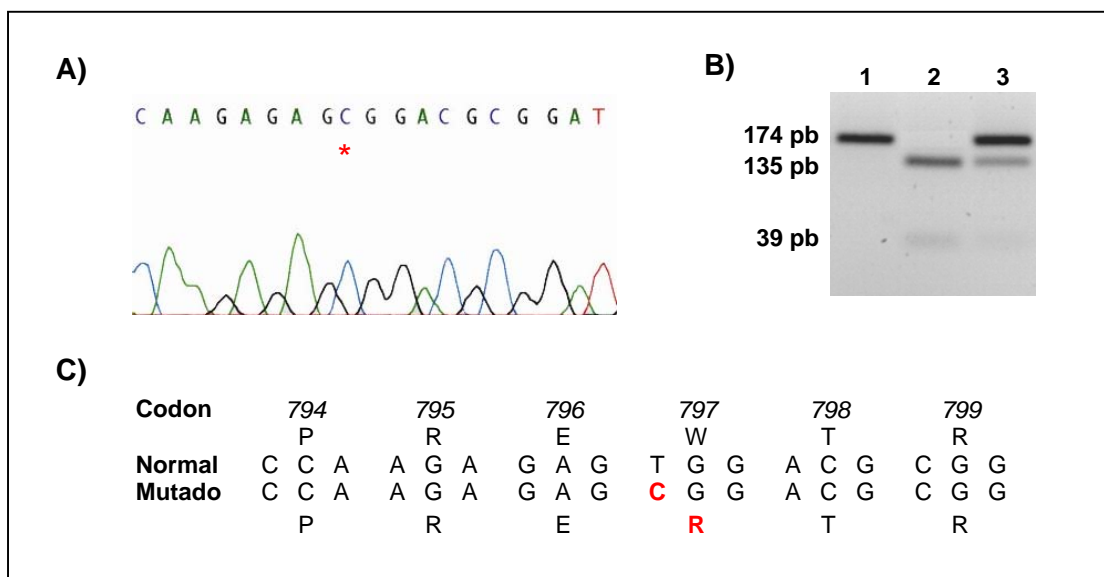


Figura 44. Mutación W797R en el gen PYGM.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución T→C en el codón 797 es indicada por un asterisco. B) PCR-PIRA con *Hha* I en gel de agarosa al 2,5 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: control, calle 2: paciente 19, homocigoto para W797R, calle 3: paciente 20, heterocigoto para W797R. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

1.2.3. Análisis genético-molecular familiar

En los pacientes con enfermedad de McArdle en los que se ha podido estudiar a miembros de la familia, se analizaron las mutaciones en ADN aislado a partir de muestras sanguíneas. En la figura 45 se muestran los resultados obtenidos en algunas de las familias estudiadas, en las que, de manera general, se puede observar la transmisión autosómica recesiva de los alelos analizados.

1.2.4. Epidemiología molecular

En la tabla XII se muestran los alelos mutados del gen *PYGM* de los 38 pacientes estudiados. Las cuatro mutaciones más frecuentes en esta serie (R49X, W797R, G204S y 753delA) representan el 75% de los alelos identificados (65% - 85% de los alelos con un intervalo de confianza del 95%) (Fig. 46). Si se hubieran utilizado estas cuatro mutaciones como estrategia de rastreo molecular se habrían caracterizado definitivamente el 60% de los pacientes con enfermedad de McArdle (44% - 76% de los pacientes con un intervalo de confianza del 95%).

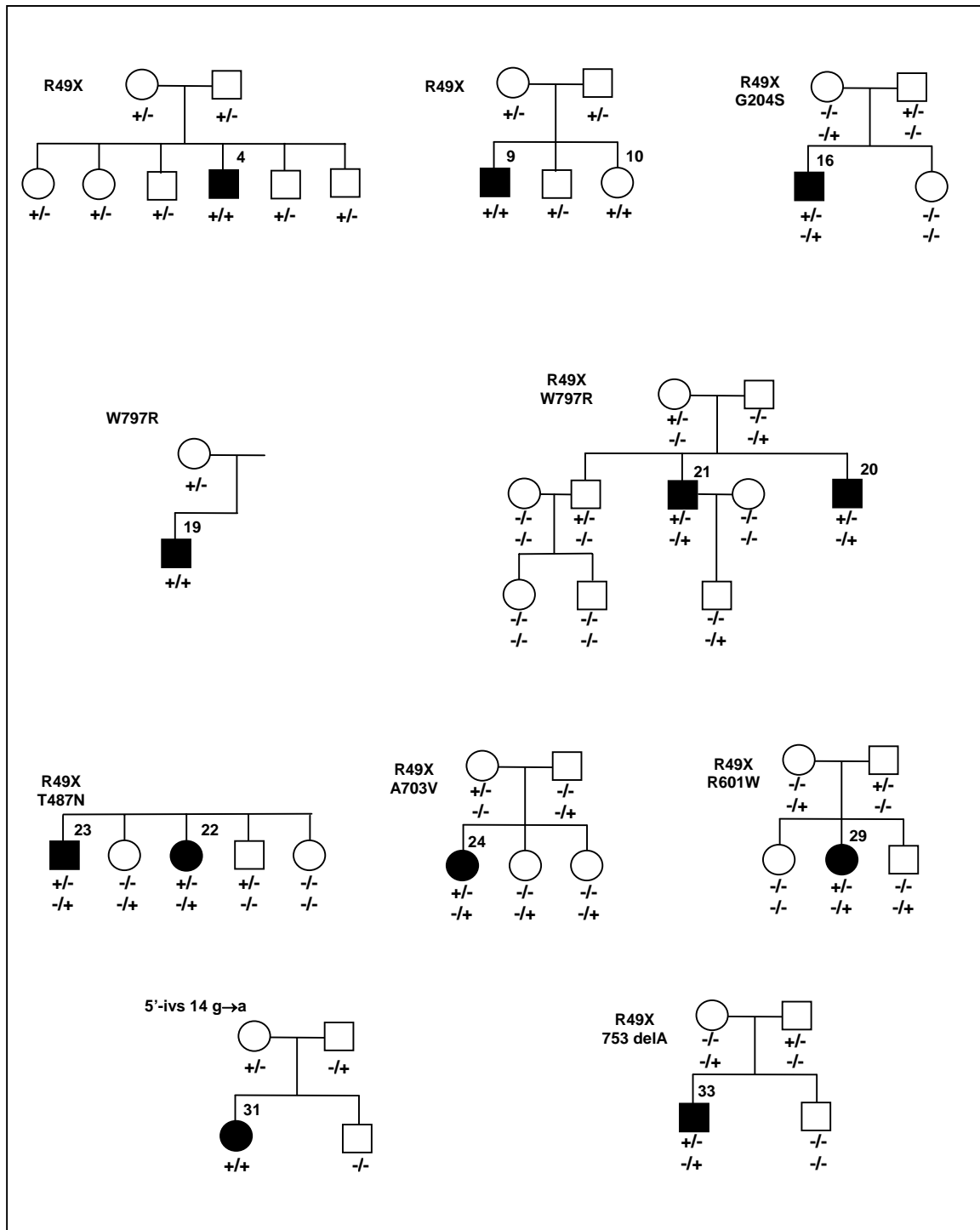


Figura 45. Análisis molecular en familias con enfermedad de McArdle

Los símbolos negros indican pacientes con síntomas de la enfermedad. El número representa el paciente correspondiente en la tabla XI. ++ homocigoto, +/- heterocigoto, -/- normal para cada una de las mutaciones. En caso de familias con dos mutaciones (heterocigosis compuesta) el status genético de cada miembro se representa en dos filas cada una de las cuales se relaciona con las mutaciones indicadas en la parte superior de cada árbol familiar

Tabla XII. Alelos del gen *PYGM* identificados en 38 pacientes con enfermedad de McArdle pertenecientes a 31 familias.

<i>R49X</i>	43	<i>R324G</i> *	1	<i>533 delA</i> *	2	<i>A703V</i> *	1
<i>E124X</i> *	2	<i>E348K</i> *	1	<i>5'ivs14</i>	2	<i>753 delA</i>	3
<i>R193W</i> * +							
<i>794/795 delAA</i> *	2	<i>387 insA/del8bp</i> *	2	<i>R601W</i> *	1	<i>Q754X</i> *	1
<i>G204S</i>	5	<i>T487N</i> *	2	<i>A659D</i> *	2	<i>W797R</i> *	6

* Alelos nuevos mutados encontrados en este estudio.

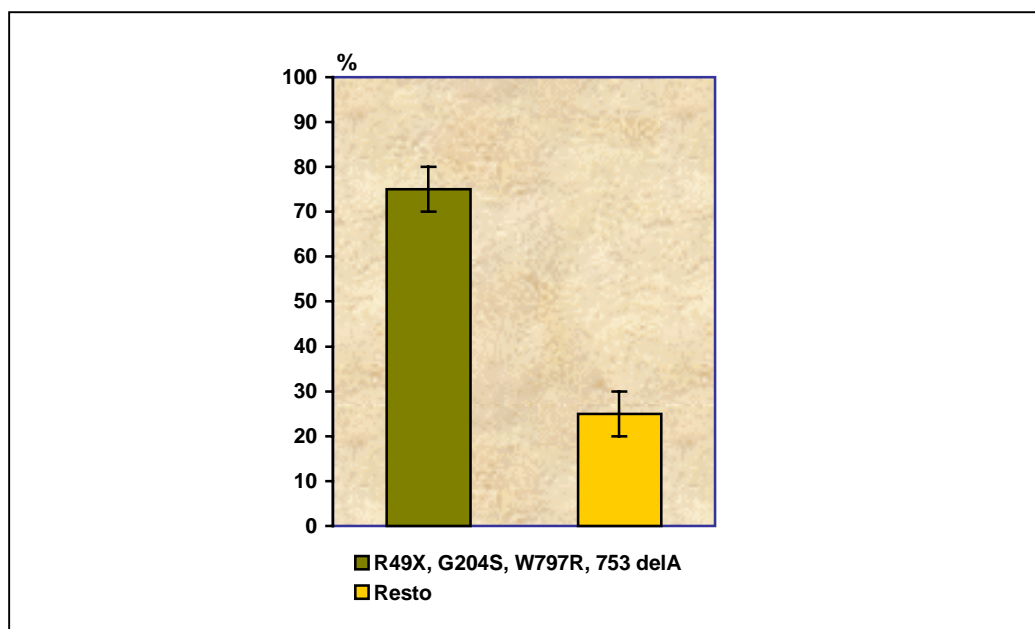


Figura 46 . Distribución porcentual de los cuatro alelos más frecuentes del gen *PYGM* en pacientes con enfermedad de McArdle.

2. Deficiencia de fosfofructoquinasa muscular

2.1. Análisis bioquímico

2.1.1. Variabilidad y valores de referencia

Los resultados de la variabilidad analítica y biológica se muestran en la tabla XIII.

Tabla XIII. Estudio de variabilidad del método de determinación de actividad de fosfofructoquinasa muscular

	<i>Imprecisión intradía</i>		<i>Imprecisión intraindividual</i>	
N	10	10	10	10
X	34,5	9,7	45,9	27,7
SD	1,88	0,61	4,42	3,10
CV (%)	5,5	6,3	10	11

N: número de determinaciones; X: media aritmética, SD: desviación estándar;

CV: coeficiente de variación

Se han utilizado 19 individuos control para la obtención de valores de referencia de fosfofructoquinasa muscular. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla XIV.

Tabla XIV. Valores de referencia de fosfofructoquinasa en tejido muscular

Individuos	19
Edad (X±SD)	29 ± 6
PFK muscular ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g tejido}^{-1}$)	
X	35,7
SD	8,8
P _{97.5}	49,5
P ₅₀	35,8
P _{2.5}	23,0

X: media aritmética, SD: desviación estándar,

P: percentil.

Teniendo en cuenta la variación biológica y el percentil 2,5 de los valores de referencia, se ha tomado $20,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g tejido}^{-1}$ como valor de decisión en el diagnóstico de déficit de fosfofructoquinasa muscular.

2.1.2. Caracterización bioquímica

Se ha realizado la determinación de la actividad fosfofructoquinasa muscular a un total de 6 individuos con indicación clínica e histológica de padecer una deficiencia de fosfofructoquinasa en músculo esquelético siguiendo la estrategia diagnóstica planteada en los métodos (Fig. 13). En 3 de ellos la actividad PFK muscular fue indetectable y coincidieron con una ausencia de tinción en la reacción histoquímica de PFK. Los otros 3 mostraron una actividad alrededor del 50% respecto al valor de decisión de déficit de PFK, y aunque presentaron tinción en la reacción histoquímica, ésta fue menos intensa, calificándose de tinción pálida.

Las principales características clínicas, de laboratorio clínico e histológicas de estos 6 pacientes, así como su actividad PFK en músculo esquelético, son mostradas en en la tabla XV.

2.2. Caracterización genético-molecular

2.2.1. Análisis de PCR-RFLP

Para intentar caracterizar molecularmente a alguno de los 6 pacientes con déficit bioquímico de PFK se estudió la mutación R39P en el exón 4 del gen *PFKM*. Se analizó únicamente esta mutación y no otras, por tres razones: (i) la gran variabilidad genética de esta enfermedad, (ii) la ausencia de una mutación predominante que permitiera un estudio de cribado mutacional preliminar, y (iii) por su descripción en homocigosis en un paciente de origen italiano (100) y en otro paciente, también italiano, que resultó ser un caso de “doble problema” junto a la mutación Q12X del gen *AMPD1* (108), teniendo en cuenta la posibilidad de un origen étnico común a los españoles. La mutación R39P no se detectó en ninguno de los seis pacientes con déficit de PFK muscular estudiados (Fig. 47).

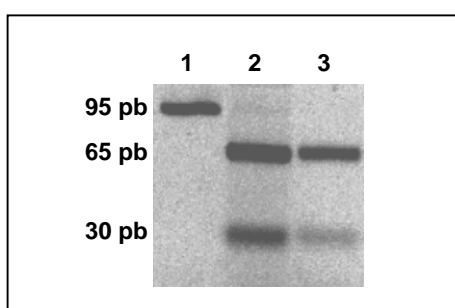


Figura 47. PCR-RFLP de la mutación R39P en el gen *PFKM*.

Calle 1: producto de PCR, calle 2: paciente 6 de la tabla XV, calle 3: control.
Ver el apartado métodos para más explicaciones.

Tabla XV. Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con enfermedad de Tarui.

Pacientes	1	2	3	4	5	6
<i>Clínica</i>						
Sexo	V	V	V	M	V	M
Edad de inicio	17	12	9	16	11	6
Edad actual	17	21	10	26	27	21
CK en reposo	300	1060	1200	550	750	600
Curva isquémica de lactato	NR	Plana	Plana	NR	NR	Plana
Mioglobinuria	NO	SI	NO	NO	SI	NO
<i>Histología</i>						
PAS	+	+	NR	+	+	NR
Histoquímica PFK	A	A	P	P	P	A
<i>Análisis Bioquímico</i>						
Actividad PFK muscular	ND	ND	9,5	13,0	11,7	ND
<i>Análisis molecular</i>						
R39P	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Q12X-AMPD1	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
<p>V: varón; M: mujer; ND: indetectable; NR: no realizado; PAS: Acido peryódico de Schiff, histoquímica para glucógeno; PFK: fosfofructoquinasa; Q12X-AMPD1: mutación Q12X del gen para mioadenilato desaminasa; A: ausencia de tinción; P: reacción histoquímica calificada por el patólogo como pálida o ténue.</p>						

3. Deficiencia de mioadenilato desaminasa

Siguiendo la estrategia de caracterización bioquímico-molecular de intolerancias al ejercicio planteada en la sección metodológica (Fig. 13), la detección de pacientes con déficit de MADA se ha indagado a partir de datos clínicos, de laboratorio (especialmente de la curva de amonio en isquemia) y fundamentalmente a partir de datos histoquímicos, a causa de que en la institución dónde se ha realizado esta tesis la reacción histoquímica para MADA forma parte del protocolo de diagnóstico para la mayoría de las biopsias musculares que pertenecen a pacientes con sospecha de miopatía metabólica. Por este motivo, la reacción histoquímica para MADA se ha determinado durante 5 años en 400 biopsias musculares, encontrándose 6 pacientes positivos para la misma (ausencia de tinción), que representa el 1,5% del total de biopsias con sospecha de miopatía metabólica (intervalo de confianza del 95%: 0,3%-2,7%).

En estos 6 pacientes con déficit histoquímico de MADA, se ha investigado la única mutación descrita, Q12X, del gen *AMPD1*, resultando todos ellos homocigotos (Fig. 47). Por otra parte, y dado el debate que actualmente existe sobre la patogenicidad de este déficit, en estos pacientes se realizaron estudios bioquímicos y genéticos adicionales que comprenden las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, de miofosforilasa, fosfofructoquinasa y carnitina-palmitil transferasa en homogenado muscular, así como la tipificación de algunas mutaciones en el ADN mitocondrial y en los genes *PYGM*, *PFKM* y *CPT2*. Después de llevar a cabo todos estos estudios se observó que 3 de estos pacientes contenían únicamente la mutación Q12X en el gen *AMPD1*; dos mostraban además, una deficiencia de miofosforilasa, resultando ambos homocigotos para la mutación R49X del gen *PYGM* (pacientes 6 y 11 en la tabla XI); y el otro sujeto homocigoto para Q12X, cuyo fenotipo clínico predominante sugería una enfermedad mitocondrial, presentó la mutación heteroplásmica A3243G en el ARNt-Leu^(UUR) en el ADN mitocondrial (Tabla XVI).

Como consecuencia de dicha controversia, se ha analizado la mutación Q12X en sujetos control para determinar la frecuencia de heterocigotos en nuestra población. Así, se encontraron 9 heterocigotos en 50 pacientes controles (edad $X \pm SD$: 34 ± 5 ; 46% mujeres), es decir, enfermos sin patología muscular metabólica (10 con neoplasia, 10 con trastornos genitourinarios, 10 con diabetes, 10 con alteraciones hepáticas y 10 con enfermedades cardiovasculares), y 17 heterocigotos en 100 sujetos control seleccionados aleatoriamente del Servicio de Donantes de Sangre del Hospital 12 de Octubre de Madrid (edad $X \pm SD$: 36 ± 6 ; 40% mujeres). En total, estos hallazgos representan el 17,3% , con

un intervalo de confianza del 95% de 11,3%-23,3% de heterocigosis en nuestra población.

Tabla XVI. Hallazgos clínicos, histológicos, y moleculares en pacientes con deficiencia de mioadenilato desaminasa.

Pacientes	1	2	3	4	5*	6**
Clínica						
Sexo	V	V	V	M	V	V
Edad de inicio	20	8	30	40	6	8
Edad actual	33	20	40	51	13	25
Intolerancia al ejercicio †	1	1	1	0	2	3
CK en reposo	420	280	370	100	1440	2200
Curva isquémica de amonio	plana	plana	plana	plana	plana	plana
Curva isquémica de lactato	normal	normal	normal	normal	plana	plana
Mioglobinuria	NO	NO	NO	NO	NO	SI
Otros hallazgos	-	-	EMG-mp	PEO DMHM	-	-
Histología						
Histoquímica MADA	A	A	A	A	A	A
Otros hallazgos	-	-	-	FRR	-	-
Análisis molecular						
Q12X- <i>AMPD1</i>	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
A3243G- <i>ADNmt</i>	NR	NR	NR	HTP 60% (Mu)	NR	NR
R49X- <i>PYGM</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+

* paciente 11 y ** paciente 6 de la tabla XI; † grado de intolerancia al ejercicio: 0, ausente, 1, ligera, 2, moderada, 3 marcada; V: varón; M: mujer; MADA: mioadenilato desaminasa; A: ausencia de tinción histoquímica para MADA; Q12X-*AMPD1*: mutación Q12X del gen de la mioadenilato desaminasa; A3243G-*ADNmt*: mutación en el nucleótido 3243 del ARNt-Leu^(UUR) en el ADN mitocondrial; R49X-*PYGM*: mutación R49X del gen de la miofosforilasa; EMG-mp: electromiograma con un patrón miopático; PEO: oftalmoplejía progresiva externa; DMHM: diabetes mellitus de herencia materna; FRR: fibras rojo - rasgadas; +/+ : mutación presente en ambos alelos; -/-: ausencia de mutación; NR: no realizada; HTP 60% (Mu): porcentaje de heteroplasmia de la mutación A3243G en tejido muscular.

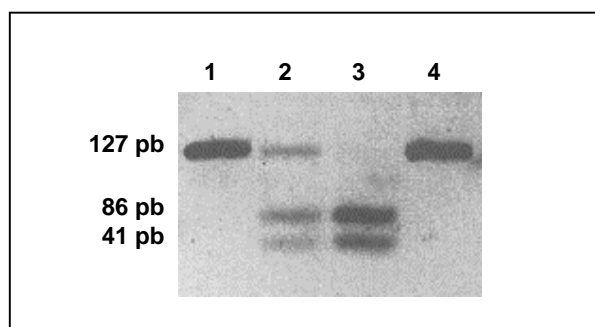


Figura 47. PCR-PIRA de la mutación Q12X en el gen AMPD1.

Calle 1: paciente 1 de la tabla XVI. Calle 2 : paciente 3 de la tabla XI, heterocigoto. Calle 3: control. Calle 4: producto de PCR.

Ver el apartado métodos para más explicaciones.

4. Deficiencia de carnitina-palmitil transferasa

4.1. Análisis bioquímico

4.1.1. Variabilidad y valores de referencia.

Los resultados de la variabilidad analítica y biológica se muestran en la tabla XVII.

Tabla XVII. Estudio de variabilidad del método intercambio isotópico para la determinación de actividad de CPT muscular

	<i>Imprecisión intradía</i>		<i>Imprecisión intraindividual</i>	
N	10	10	10	10
X	0,36	0,23	0,48	0,30
SD	0,032	0,030	0,068	0,051
CV (%)	8,8	13,0	14,1	17,0

N: número de determinaciones; X: media aritmética, SD: desviación estándar;

CV: coeficiente de variación

Se han utilizado 30 individuos control para la obtención de valores de referencia de CPT muscular medida mediante el método de intercambio isotópico. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XVIII.

Tabla XVIII. Valores de referencia de CPT en tejido muscular (método de intercambio isotópico)

Individuos	30
Edad (X±SD)	26 ± 5
CPT (nmol min⁻¹ mg NCP⁻¹)	
X	0,45
SD	0,15
P _{97.5}	0,76
P ₅₀	0,38
P _{2.5}	0,25

X: media aritmética, SD: desviación estándar; P: percentil

En este estudio se ha utilizado 0,21 nmol min⁻¹ mg NCP⁻¹ como valor de decisión en el diagnóstico de déficit de CPT muscular, basándose en el percentil 2,5 de los valores de referencia y la variabilidad biológica intraindividual.

4.1.2. Caracterización bioquímica.

En el ámbito clínico de las intolerancias metabólicas al ejercicio, los pacientes con signos y síntomas habituales de este tipo de deficiencias en los que se han descartado clínica e histoquímicamente los déficits de miofosforilasa, fosfofructoquinasa y mioadenilato desaminasa, se enfocan hacia un posible déficit de CPT muscular. Éste debe ser descartado debido a que no se dispone de una tinción histoquímica para CPT II. Por tanto, durante el desarrollo de esta tesis la actividad CPT muscular ha sido determinada a un total de 150 individuos con indicación clínica o histológica (por descarte) de padecer una deficiencia de CPT siguiendo la estrategia de caracterización bioquímico-molecular planteada en métodos (Fig. 13). De todos ellos se ha observado déficit de CPT en músculo esquelético en 14 individuos pertenecientes a 13 familias (los pacientes 9 y 10 son hermanos) (Tabla XIX). Esta cifra representa el 9,3 % de todos los individuos a los que se determinó CPT muscular, con un intervalo de confianza del 95% de 4,5 % a 14,1 %. (Fig. 48).

Los datos clínicos, de laboratorio e histológicos más relevantes de estos 14 pacientes, así como su actividad enzimática de CPT en músculo esquelético, se pueden observar en la tabla XIX. En cuatro de ellos (sujetos 1, 6, 13 y 15) el déficit de CPT II en tejido muscular fue comprobado utilizando además el método “forward” de determinación

de CPT, mediante el cual no se detectó actividad insensible a malonil-CoA en ninguno de ellos.

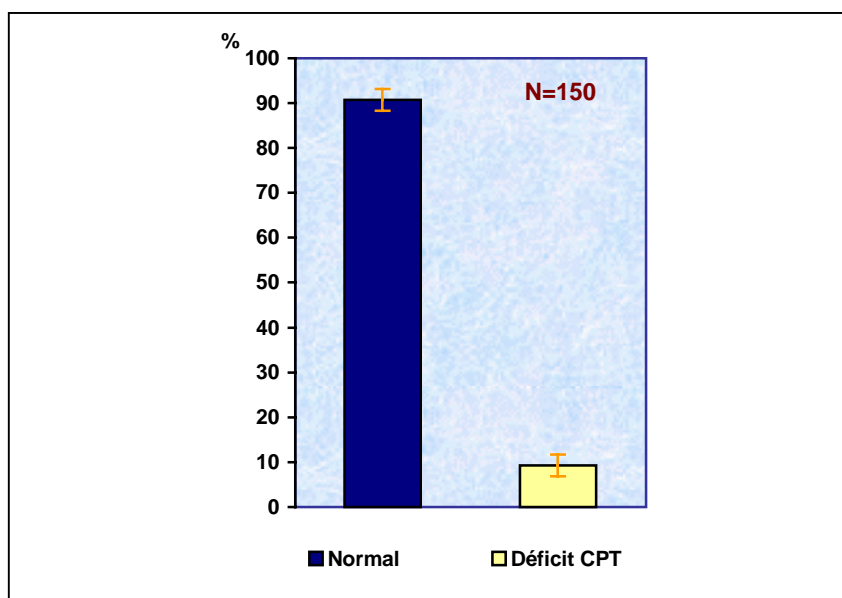


Figura 48 . Distribución porcentual de individuos en los que se ha realizado la determinación bioquímica de CPT en tejido muscular.

4.2. Caracterización genético-molecular

4.2.1. Análisis de PCR-RFLP

Mediante esta metodología se han analizado tanto la mutación descrita más frecuentemente en estos pacientes, S113L en el exón 3 del gen *CPT2*, como otras mutaciones más raras tales como la mutación P50H (exón 1) y dos mutaciones del exón 5, Y628S y R631C. El estudio se realizó en 16 pacientes, 14 con déficit bioquímico de CPT muscular, y 2 casos adicionales en los que no se practicó biopsia muscular y se aisló ADN a partir de muestras sanguíneas, que se consideraron déficits de CPT II por ser hermanos sintomáticos de pacientes con déficit bioquímico de CPT muscular (los casos 1 y 2, y, 3 y 4 son hermanos) (Tabla XIX). No se han tenido en cuenta los pacientes en los que únicamente se pudo obtener sangre, debido a que los datos clínicos o las pruebas de laboratorio no poseen la suficiente capacidad diagnóstica para sugerir un déficit probable de CPT, al contrario que en otras enfermedades (p. ej. curvas planas de lactato y amonio en las pruebas de isquemia).

En resumen, se han analizado, mediante despitaje mutacional, 16 pacientes pertenecientes a 13 familias diferentes (Tabla XIX), de los cuales ninguno presentó las mutaciones R631C y Y628S. En un único paciente se encontró de forma heterocigota la mutación P50H (Fig. 49). El alelo His-50 contenía el polimorfismo V368I, pero no el M647V, es decir era un alelo IHM (188). La mutación S113L (Fig. 49) se observó en los dos alelos (homocigosis) de 10 pacientes, y en heterocigosis en cuatro (Fig. 50). Todos los alelos Leu-113 contaban los polimorfismos V368I y M647V, alelos ILV (191). No se demostró la presencia de heterocigotos compuestos analizando estas cuatro mutaciones. Utilizando esta metodología se caracterizaron 25 de los 32 alelos analizados, es decir el 78 % de los mismos, correspondiendo el 75% a la mutación S113L (intervalo de confianza al 95% = 60%-90%) (Fig. 50).

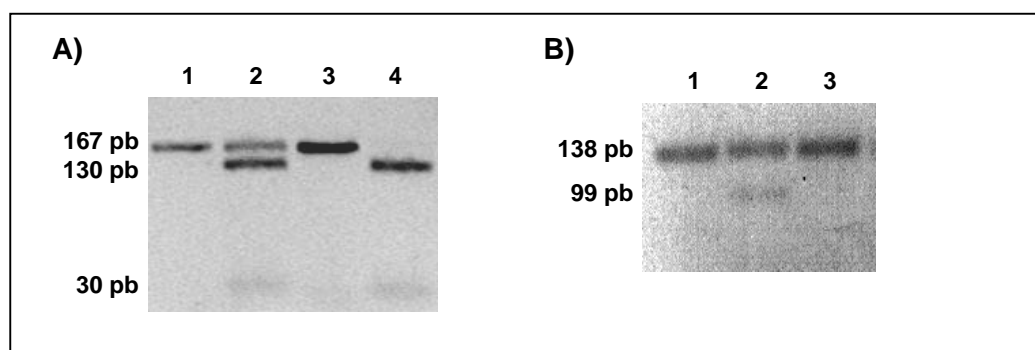


Figura 49. Análisis de las mutaciones S113L (panel A) y P50H (panel B) en el gen CPT2 mediante PCR-PIRA.

Panel A: calle 1: producto de PCR, calle 2: paciente heterocigoto para S113L, calle 3: control, calle 4: paciente homocigoto para S113L. Panel B: calle1:producto de PCR; calle 2: paciente heterocigoto para P50H, calle 3: control. Ver el apartado métodos para más explicaciones.

4.2.2. Análisis de secuenciación

Los 6 pacientes con deficiencia de CPT que no pudieron ser caracterizados molecularmente de forma definitiva mediante el análisis de las cuatro mutaciones citadas en el apartado anterior, es decir 5 pacientes con un sólo alelo identificado (4 con la mutación S113L y uno con la mutación P50H) y un paciente en el que no se identificó ningún alelo mutado (Tabla XIX), fueron sometidos a análisis de secuenciación directa del gen *CPT2*. Se han secuenciado 7 alelos que presentaron las mutaciones que se describen a continuación (Fig. 51).

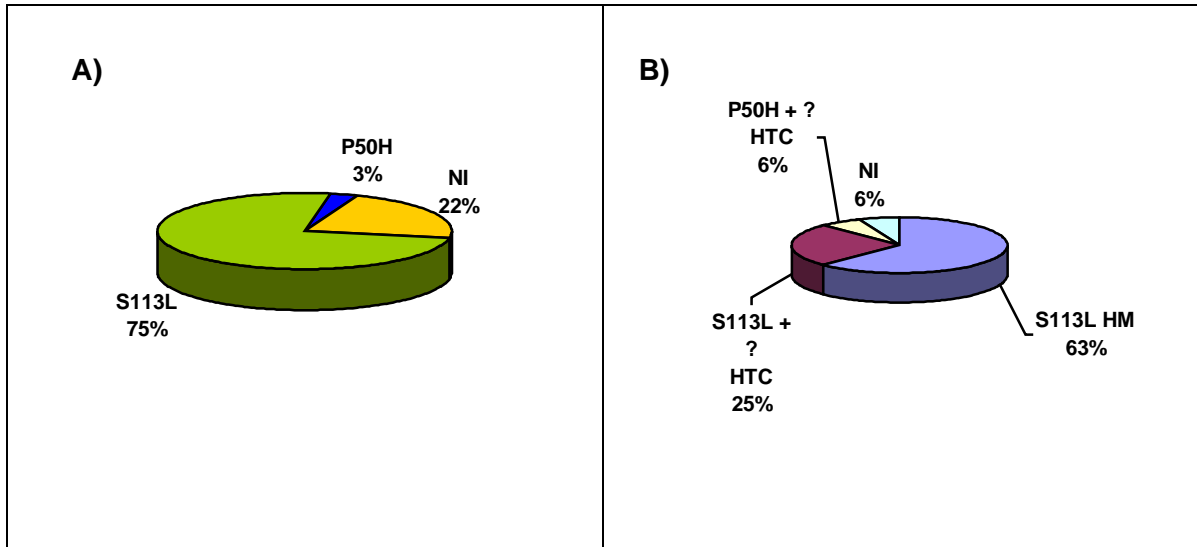


Figura 50. Análisis de cribado molecular utilizando las mutaciones S113L, P50H, Y628S y R631C en 16 pacientes con déficit de CPT. A) distribución alélica, B) distribución porcentual de pacientes.

HT: heterocigoto, HM: homocigoto; HTC: heterocigoto compuesto; NI: no identificado; ?: mutación desconocida.

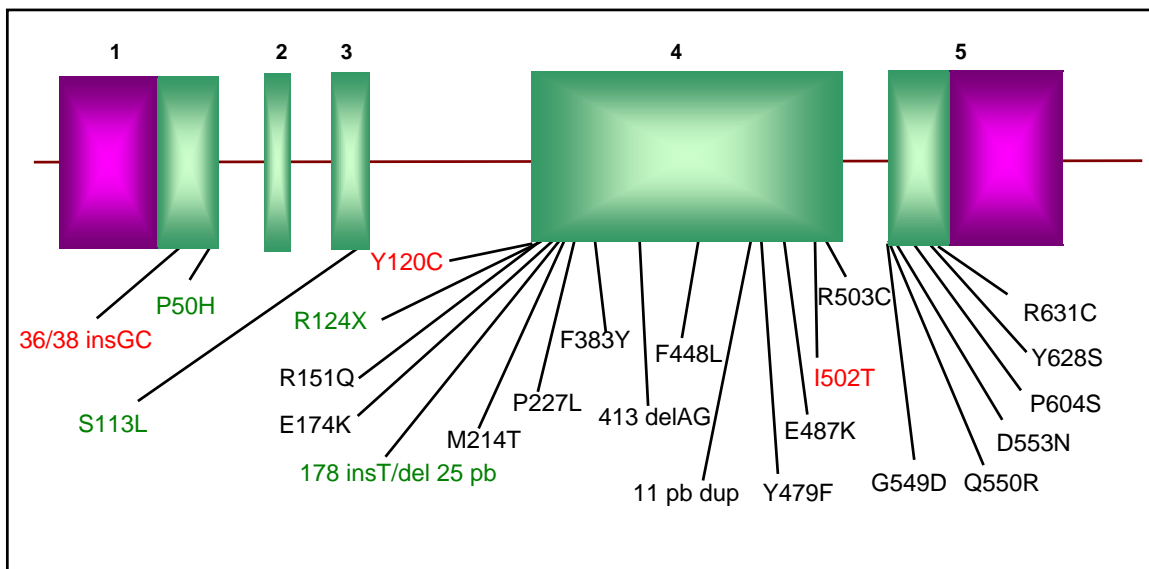


Figura 51. Localización de mutaciones en el gen CPT2 asociadas con deficiencia de CPT II.

En rojo se indican las nuevas mutaciones identificadas en esta tesis. En verde se representan las mutaciones encontradas en esta tesis previamente descritas. Los rectángulos representan a los exones. Las zonas de color rosa indican las regiones no traducibles. ins: inserción; del: delección; dup: duplicación; pb: pares de bases.

Tabla XIX. Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con deficiencia de carnitina-palmitil transferasa II.

Pacientes	1	2	3	4	5	6
Clínica						
Sexo	V	M	V	M	M	M
Edad de inicio	12	14	8	14	24	17
Edad actual	37	26	10	18	41	32
Mioglobinuria	SI	NO	SI	NO	SI	SI
Histología						
Hallazgos relevantes	Lípidos	-	-	-	-	-
Análisis Bioquímico						
Actividad CPT muscular*	0,10**	S	0,03	S	0,08	0,20**
Análisis molecular						
S113L	+/-	+/-	+/+	+/+	-/-	+/+
P50H	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Otras mutaciones <i>CPT2</i>	Y120C	Y120C			I502T	
	+/-	+/-			+/+	
Alelos mutados	ILV	ILV	ILV	ILV	ITM	ILV
	ICV	ICV	ILV	ILV	ITM	ILV
Q12X- <i>AMPD1</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

V: varón; M: mujer; Q12X-*AMPD1*: mutación Q12X del gen para mioadenilato desaminasa; S: muestra sanguínea . * Método de intercambio isotópico (nmol min⁻¹ mg NCP⁻¹). ** La actividad CPT insensible a malonil-CoA por el método "forward" resultó indetectable en los pacientes 1 y 6 . ILV: alelo con la sustitución S113L y los polimorfismos V368I y M647V. ICV: alelo con la mutación Y120C y los polimorfismos V368I y M647V. ITM: alelo con la sustitución I502T y el polimorfismo V368I pero no M647V.

Tabla XIX (Cont.). Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con deficiencia de carnitina-palmitil transferasa II.

Pacientes	7	8	9	10	11	12
Clínica						
Sexo	M	V	V	V	V	V
Edad de inicio	12	10	12	14	8	14
Edad actual	23	18	21	17	13	21
Mioglobinuria	SI	SI	SI	SI	SI	SI
Histología						
Hallazgos relevantes	-	-	-	-	-	-
Análisis Bioquímico						
Actividad CPT muscular*	0,06	0,02	0,04	0,10	0,04	0,11
Análisis molecular						
S113L	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/-
P50H	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-
Otras mutaciones <i>CPT2</i>					178 insT/ del 25pb -/+	36/38 insGC -/+
Alelos mutados	ILV	ILV	ILV	ILV	IHM	ILV
	ILV	ILV	ILV	ILV	VdelM	VinsM
Q12X- <i>AMPD1</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

V: varón; M: mujer; Q12X-*AMPD1*: mutación Q12X del gen para mioadenilato desaminasa; S: muestra sanguínea. * Método de intercambio isotópico (nmol min⁻¹ mg NCP⁻¹). ILV: alelo con la sustitución S113L y los polimorfismos V368I y M647V. IHM: alelo con la mutación P50H y el polimorfismo V368I pero no M647V. VdelM: alelo con la mutación 178 insT/del 25pb sin los polimorfismos V368I y M647V. VinsM: alelo con la microlesión 36/38 insGC sin los polimorfismos V368I y M647V.

Tabla XIX (Cont.). Hallazgos clínicos, histológicos, bioquímicos y moleculares en pacientes con deficiencia de carnitina-palmitil transferasa II.

Pacientes	13	14	15	16
<i>Clínica</i>				
Sexo	V	M	M	M
Edad de inicio	12	10	35	12
Edad actual	22	25	39	15
Mioglobinuria	SI	SI	SI	SI
<i>Histología</i>				
Hallazgos relevantes	-	-	-	-
<i>Análisis Bioquímico</i>				
Actividad CPT muscular*	0,08**	0,01	0,06**	0,03
<i>Análisis molecular</i>				
S113L	+/+	+/+	+/+	+/-
P50H	-/-	-/-	-/-	-/-
Otras mutaciones <i>CPT2</i>				R124X -/+
Alelos mutados	ILV ILV	ILV ILV	ILV ILV	ILV VXM
Q12X- <i>AMPD1</i>	-/-	-/-	-/-	-/-

V: varón; M: mujer; Q12X-*AMPD1*: mutación Q12X del gen para mioadenilato desaminasa; S: muestra sanguínea . * Método de intercambio isotópico (nmol min⁻¹ mg NCP⁻¹). ** La actividad CPT insensible a malonil-CoA por el método "forward" resultó indetectable en los pacientes 13 y 15 . ILV: alelo con la sustitución S113L y los polimorfismos V368I y M647V. VXM: alelo con la mutación R124X sin los polimorfismos V368I y M647V

4.2.2.1. Mutaciones conocidas

En el paciente 11 (Tabla XIX), que era heterocigoto para P50H se encontró en el otro alelo la mutación 178 insT/del 25pb descrita por Yang y cols. (189), el cuál no contenía los polimorfismos V368I y M647V (Fig. 51). El análisis de secuenciación reveló la presencia de la mutación R124X en heterocigosis en el paciente 16, que era heterocigoto para S113L (Tabla XIX); dicha mutación había sido descrita por Yang y cols. (192) y no contenía los polimorfismos V368I y M647V.

4.2.2.2. Nuevas mutaciones

Se han encontrado 3 nuevas mutaciones (Tabla XIX): una microinserción (36/38 insGC) y dos mutaciones “de sentido equivocado” (Y120C e I502T) (Fig. 51).

i) Mutación 36-38 insGC

En el paciente 12, que era heterocigoto para S113L, se observó en el otro alelo una inserción de dos nucleótidos GC en los codones 36-38 en el exón 1. Esta alteración conlleva el desplazamiento de la pauta de lectura, activándose un nuevo triplete de parada de la traducción en la posición 73, lo que predice la síntesis de un polipéptido con aproximadamente un 10% del tamaño normal (72 aminoácidos en lugar de 658) (Fig. 52). EL alelo 36-38 insGC no contenía los polimorfismos V368I y M647V. La microinserción se confirmó mediante análisis de PCR-RFLP, amplificando un fragmento de 292 pb utilizando los cebadores CPT1F y CPT1R, que es digerido en dos de 208 pb y 84 pb en presencia de un alelo normal cuando se trata con el enzima de restricción *BssH II* (5'-G[↓]CGCGC-3'). La inserción crea un nuevo sitio de restricción para *BssH II*, de manera que el fragmento de restricción de 210 pb (fragmento 2 pb más largo debido a la inserción) es cortado por el enzima en dos productos de 123 pb y 87 pb cuando existe un alelo delecionado (Fig. 52).

ii) Mutación Y120C

Los pacientes 1 y 2, que son hermanos, resultaron heterocigotos compuestos para la mutación S113L y una nueva mutación, Y120C, causada por una transición A → G en el exón 4 (Fig. 53), que produce la sustitución de tirosina (TAC) por cisteína (TGC) en el codon 120. El alelo Cys-120 contenía ambos polimorfismos V368I y M647V, alelo ICV. La presencia de la mutación se comprobó mediante análisis de PCR-RFLP utilizando los cebadores CPT4AF y CPT4AR para amplificar un fragmento de 392 pb que tras tratamiento con el enzima de restricción *Rsa I* (5'-GT[↓]AC-3') es digerido en dos

fragmentos de 327 pb y 65 pb en presencia del alelo normal Tyr-601. Cuando existe el alelo mutante Cys-601 se destruye el sitio de restricción para *Rsa* I permaneciendo inalterado el producto de PCR (Fig. 53).

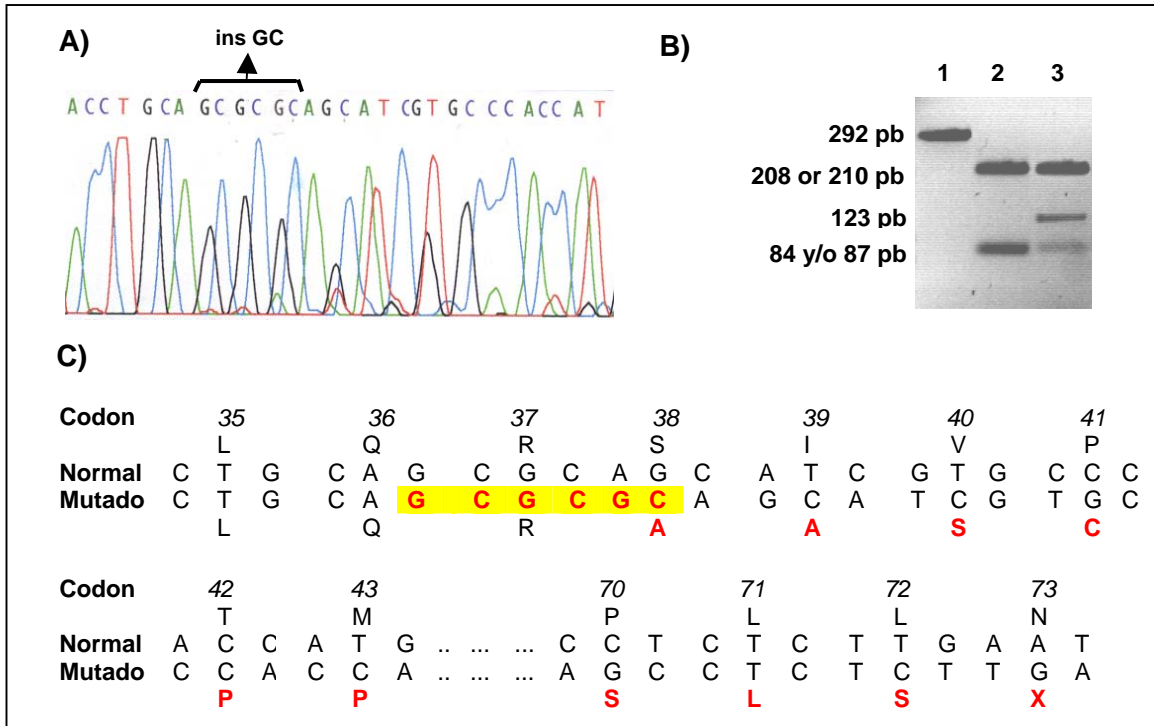


Figura 52. Mutación 36/38 insGC en el gen CPT2.

A) Análisis de secuenciación directa donde se puede observar la secuencia de alelo del exón 1 con la inserción de un dinucleótido GC. B) PCR-RFLP con *BssH* II en gel de agarosa al 3 % (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calle 2: control, calle 3: paciente 12, heterocigoto para la microinserción. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoácídica de los alelos normal y mutado. La inserción GC puede haber ocurrido en los codones 36,37, o 38 (en rojo) y conlleva el desplazamiento de la pauta de lectura del código genético cuyo resultado es la aparición de un codón de terminación en el triplete 73.

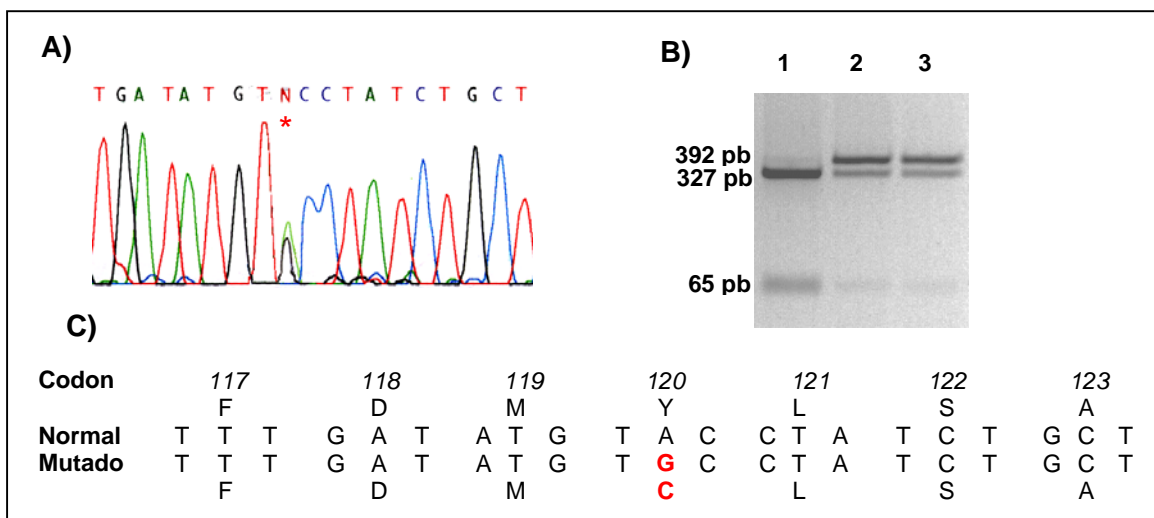


Figura 53. Mutación Y120C en el gen CPT2.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución A →G en el codón 120 es indicada por un asterisco. B) PCR-RFLP con *Rsa* I en gel de agarosa al 2% (ver explicaciones en el texto); calle 1: control, calles 2 y 3: pacientes 1 y 2 respectivamente, ambos heterocigotos para Y120C. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoácídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

iii) Mutación I502T

En el paciente 5 se puso de manifiesto una transición T → C homocigota en el exón 4 (Fig. 54), que produce la sustitución de un residuo isoleucina (ATC) por uno de treonina (ACC) en el codon 502. El alelo Thr-502 contenía el polimorfismo V368I pero no el M647V, alelo ITM. La presencia de la mutación se confirmó mediante análisis de PCR-PIRA utilizando el cebador CPT4DF y un oligonucleótido modificado 502R (5'-AAA GGC CTC AGA GCA CCT CTT TGT ATA GAC GGA GGC CGG CCG-3'), con los que se amplificó un fragmento de 263 pb que es digerido con el enzima de restricción *Bcn* I (5'-CCS[↓]GG-3') en dos fragmentos de 221 pb y 42 pb en presencia del alelo mutado Thr-502, y no es cortado cuando existe el alelo normal Ile-502 (Fig. 54).

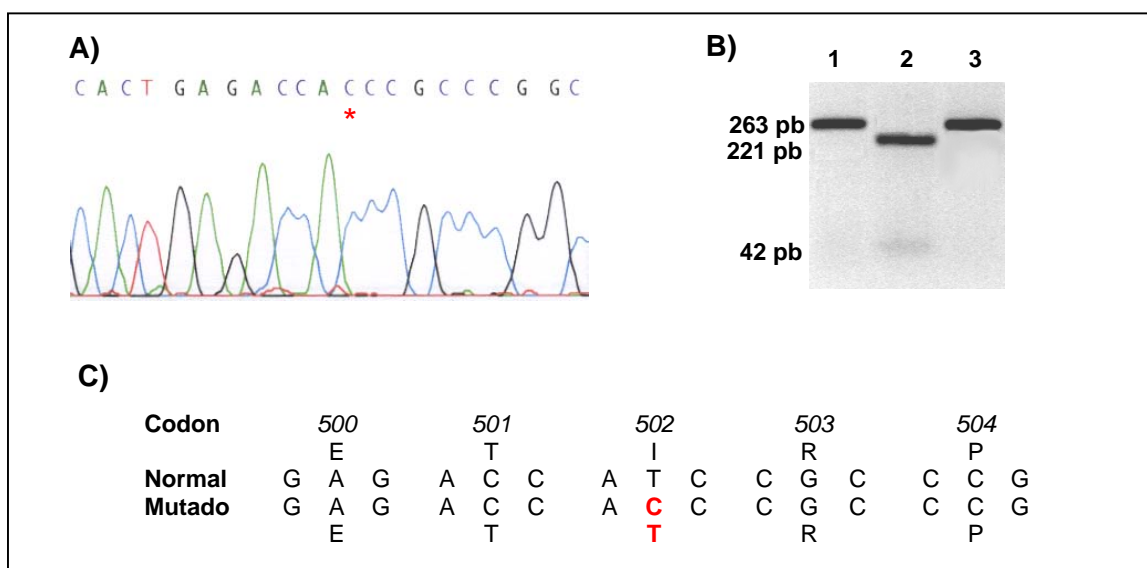


Figura 54. Mutación I502T en el gen CPT2.

A) Análisis de secuenciación directa donde la sustitución T → C en el codon 502 es indicada por un asterisco. B) PCR-PIRA con *Bcn* I en gel de agarosa al 2,5% (ver explicaciones en el texto); calle 1: producto de PCR sin digerir, calle 2: paciente 5, homocigoto para I502T, calle 3: control. C) Comparación de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de los alelos normal y mutado. Los residuos mutados en color rojo.

4.3 Análisis genético-molecular familiar

En ciertos pacientes con déficit de CPT II se ha podido estudiar molecularmente a miembros de sus familias a partir de ADN aislado de sangre. En la figura 55 se muestran algunas familias, en las que se puede corroborar la transmisión autosómica recesiva de los alelos.

4.4 Epidemiología molecular

En la tabla XX se enumeran los alelos mutados del gen *CPT2* en los 16 pacientes estudiados. Como se puede observar, la única mutación presente en más de dos alelos es la S113L, que como ya se ha comentado representa al 75% de los alelos identificados (Fig. 56). Si se utilizara como método de cribado molecular el análisis de dicha mutación podríamos caracterizar molecularmente de forma definitiva al 63% de los pacientes con déficit de CPT II, lo que representa entre 39 % y el 87% de pacientes identificados con una confianza del 95%.

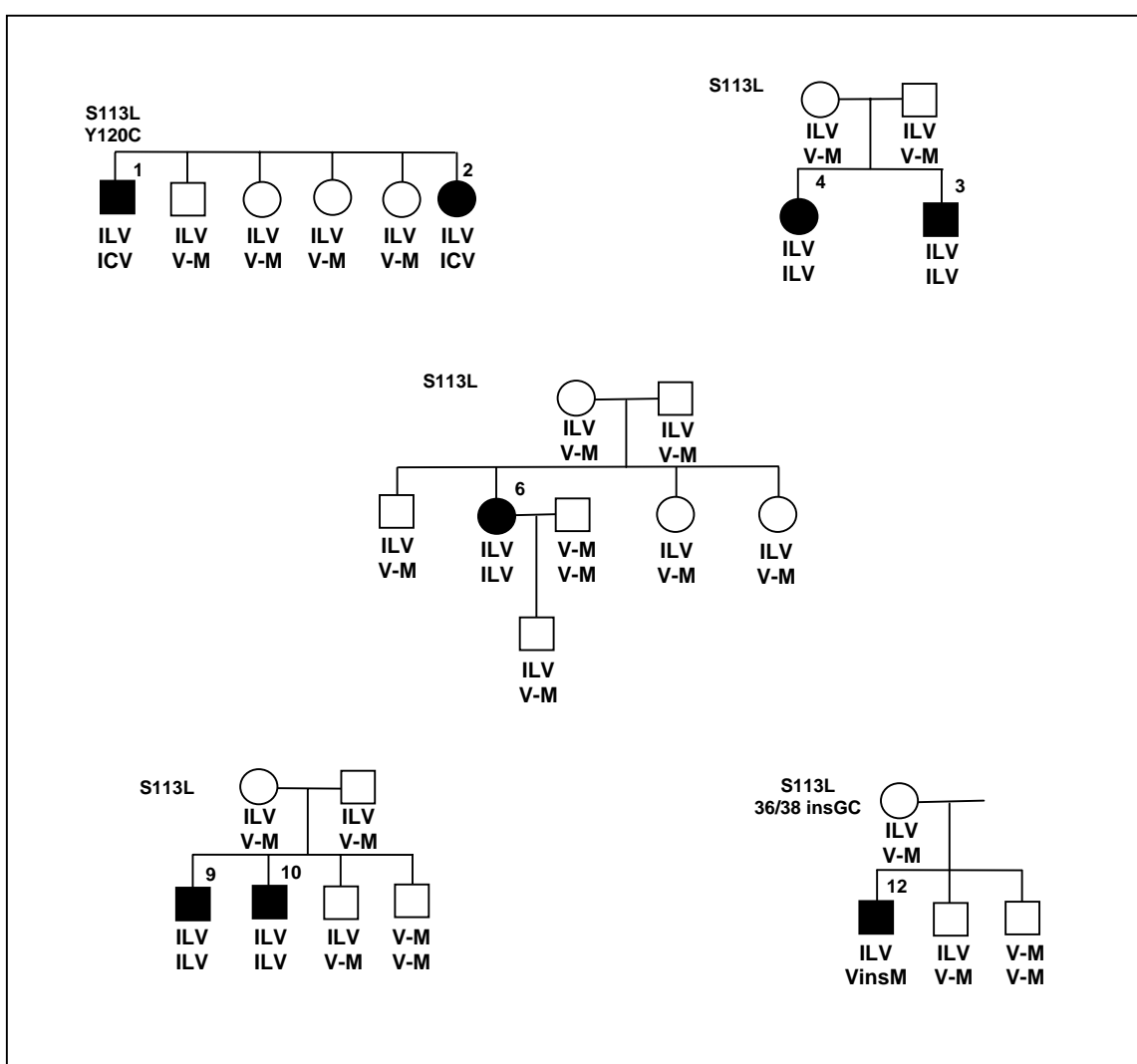


Figura 55. Análisis molecular en familias con déficit de CPT II.

Los símbolos negros indican pacientes con síntomas de la enfermedad. El número representa el paciente correspondiente en la tabla XIX. V-M: alelo normal. ILV: alelo con la sustitución S113L y los polimorfismos V368I y M647V. ICV: alelo con la mutación Y120C y los polimorfismos V368I y M647V. VinsM: alelo con la microlesión 36/38 insGC sin los polimorfismos V368I y M647V.

Tabla XX. Alelos del gen *CPT2* identificados en 16 pacientes con déficit de CPT II pertenecientes a 13 familias.

<i>36-38 insGC*</i>	1	<i>R124X</i>	1
<i>P50H</i>	1	<i>178 insT/del 25 pb</i>	1
<i>S113L</i>	24	<i>I502T*</i>	2
<i>Y120C*</i>	2		

* Alelos nuevos mutados encontrados en este estudio.

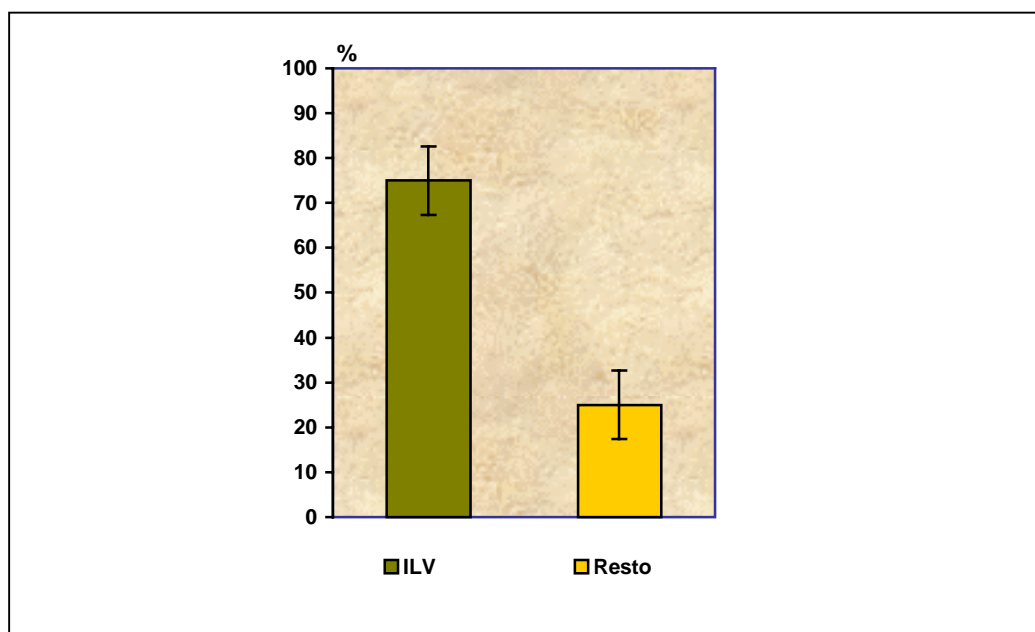


Figura 56 . Distribución porcentual del alelo ILV (con la mutación *S113L*) del gen *CPT2* en pacientes con déficit de *CPT II*.

DISCUSIÓN

1. Deficiencia de miofosforilasa

El déficit de MPL produce una miopatía metabólica típica, la enfermedad de McArdle, caracterizada por intolerancia al ejercicio, fatiga prematura, mialgias, calambres musculares y mioglobulinuria recurrente. El gen que codifica la MPL, *PYGM*, ha sido clonado, secuenciado y asignado al cromosoma 11q13 (54,55,58). Hasta el momento se habían identificado 20 mutaciones en las regiones codificantes o en los lugares de unión intrón/exón del gen, lo que ha puesto de manifiesto la heterogeneidad molecular de la enfermedad. Dichas alteraciones incluyen mutaciones “sin sentido”, “de sentido equivocado”, “en fase” y “fuera de fase”.

Clínicamente hay que reseñar que la serie de pacientes con déficit de MPL estudiada en esta tesis presenta una proporción de varones del 56%, hecho que contrasta con los datos de la literatura (1,31) dónde la proporción de varones afectados es mayor, sin que existan razones aparentes que puedan explicar estas discrepancias.

Por otra parte, las mutaciones encontradas en el gen *PYGM* deben provocar alteraciones de la estructura que impidan la función catalítica de la proteína, debido a que los pacientes en los que se pudo determinar la actividad enzimática de MPL en músculo esquelético mostraron una actividad enzimática apenas detectable (menos de $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g tejido}^{-1}$) o indetectable, es decir, menos del 4% del valor medio de los valores de referencia. Debido a que fueron caracterizados los dos alelos potencialmente patogénicos en todos los pacientes, y por tanto, en todos los sujetos en los que se realizó determinación bioquímica de MPL, se puede deducir que la calidad analítica del método de determinación bioquímica de miofosforilasa junto a los valores de referencia obtenidos permiten la detección de déficit de miofosforilasa en pacientes con sospecha clínica, histológica y de laboratorio de enfermedad de McArdle.

Muy por encima de las demás, la mutación más frecuente entre los pacientes de raza blanca es la mutación “sin sentido”, R49X. Se han encontrado frecuencias que oscilan entre 30-100% de los pacientes según la procedencia étnica de los mismos. Dicha mutación ha sido observada en 55 de 72 pacientes americanos (76%) y en 92 de 144 alelos (64%) (53,74), en 16 pacientes del Reino Unido (100%) (65) y en 26 de 32 alelos (81%), y en 6 de 9 pacientes alemanes (66%) y en 10 de 18 alelos (56%) (63). Por otra parte, este error genético fue menos común en poblaciones de origen mediterráneo, estando presente en alrededor del 50% en pacientes italianos (75) y españoles (76), con un 32% de alelos mutantes (9 de 28 alelos y 12 de 38 alelos, respectivamente). Estos resultados han llevado a algunos autores a proponer la existencia de un gradiente

decreciente Norte-Sur de esta mutación en Europa (76). Sin embargo, en esta tesis, que esta compuesta de pacientes de orígenes diversos dentro del territorio español, dicha mutación se encontró en 29 de 38 pacientes, lo que representa el 76% de los pacientes ($76 \pm 6,9$ % para un intervalo de confianza del 95%) con una frecuencia alélica del 56%. Aproximadamente la mitad de todos los pacientes con la mutación R49X fueron homocigotos (37% del todos los pacientes analizados) y el otro 50% resultaron heterocigotos compuestos. La frecuencia del alelo R49X es similar a las descritas en pacientes de procedencia norteamericana (los cuales han mezclado presumiblemente un ascendente europeo) y en pacientes alemanes, siendo menor que la obtenida en la serie británica, y superior a la que se dedujo de las series de españoles e italianos. Esta tesis incluye el mayor número de pacientes europeos descritos hasta ahora, y no apoya la hipótesis de la existencia de un gradiente Norte-Sur para la mutación R49X en Europa. Por otro lado, la mutación R49X no se ha observado en ningún paciente de origen japonés, en los cuales la mutación más frecuente parece ser la delección de un codon fenilalanina (708/709 delTTC)(70).

La mutación G204S fue bastante menos frecuente, encontrándose en 4 pacientes (10%) y en 5 alelos (7%). Tsujino y cols. (53) encontraron dicha alteración en el 20% de su serie de pacientes y en un 10% de alelos (8 de 80 alelos), considerándose la segunda mutación más frecuente descrita en pacientes caucásicos. Además, durante la realización de esta tesis se describió el primer paciente homocigoto para la mutación G204S (217).

La posible patogenicidad de las nuevas mutaciones que se identificaron en los pacientes con enfermedad de McArdle se evaluó buscando su presencia en sujetos control (ver métodos) para descartar que fueran polimorfismos dentro de nuestra población. No se encontró ninguna de las nuevas mutaciones identificadas en esta tesis en los 100 controles analizados para cada una ellas, cumpliéndose este primer criterio de patogenicidad. Otras premisas de patogenicidad fueron: (i) la disminución o ausencia de actividad enzimática en los pacientes que portaban las mutaciones, criterio que se cumplió en todas ellas, siempre que se dispusiera de tejido muscular del paciente con la nueva mutación (ver tabla XI) (ii) que dicha mutación fuera la única alteración genotípica que se encontrara en el alelo correspondiente, hecho que se cumplió en todas ellas excepto para la doble mutación en homocigosis R193W + 794/795 delAA (218) y (iii) considerar las posibles consecuencias fisiopatológicas derivadas de la alteración genotípica, que son discutidas más adelante para cada mutación en particular.

La mutación W797R se identificó en 6 alelos (8%) correspondientes a 4 pacientes (10%). En este estudio, esta mutación posee una frecuencia similar a la sustitución

G204S. Ha sido descrita por primera vez durante esta tesis (219), al mismo tiempo prácticamente que Fernández y cols. (220) (5 pacientes españoles de una serie de 10, siendo dos homocigotos). Hasta el momento solamente se ha observado en pacientes españoles, y parece ser frecuente en esta población. El Trp-797 se encuentra muy conservado, no sólo en las isoenzimas cerebral y hepática humanas, sino también en glucógeno fosforilasas de especies filogenéticamente alejadas de los humanos, tales como la levadura, la patata y *Escherichia coli* (28). La ausencia de actividad en los pacientes que llevan esta mutación es compatible con una posible degradación rápida de la proteína mutante por un cambio de su estructura secundaria inducido por la sustitución de un aminoácido aromático por uno polar en el dominio “catalítico” C-terminal (28, 219, 220).

La caracterización molecular de esta serie de pacientes con enfermedad de McArdle ha revelado la existencia de dos mutaciones que se habían descrito en una o dos familias hasta ahora. La mutación 5'ivs14 g→a, que se ha encontrado en homocigosis en el paciente 31 de este trabajo (Tabla XI), y que se había descrito en dos familias de origen caucásico (67, 71), y la mutación “fuera de fase” 753 delA que se halló en tres pacientes: uno de ellos fue heterocigoto compuesto para esta mutación y la R49X, y los otros dos, que eran hermanos, resultaron heterocigotos compuestos para esta mutación y otra nueva mutación “fuera de fase”, 387 insA/del 8pb (221). La mutación 753 delA se había descrito en homocigosis en una única familia de origen turco (73) y ha sido la cuarta alteración en cuanto a frecuencia alélica de esta serie (4%).

La ocurrencia de múltiples mutaciones explica el alto número de pacientes que poseen diferentes mutaciones en los dos alelos. 17 pacientes fueron heterocigotos compuestos (44%). En conjunto, el 60% (23 de 38) de los pacientes presentaron dos alelos mutantes que llevaban las mutaciones R49X, G204S, W797R o/y 753 delA, es decir fueron homocigotos o heterocigotos compuestos para alguna de estas cuatro mutaciones, y únicamente el 10% (4 de 38) no llevaba ninguna de estas mutaciones. Además, el hecho de que el 75% de los alelos mutantes entre los 38 pacientes (56 de 76 alelos) puedan ser identificados por análisis de PCR-RFLP para estas cuatro mutaciones hace posible el diagnóstico genético molecular a partir de la obtención de ADN de una muestra sanguínea, evitando así la biopsia muscular en una proporción significativa de pacientes.

Las mutaciones “sin sentido”, E124X y Q754X, y las mutaciones “fuera de fase”, 387 insA/del 8pb, 533 delA y 794/795 delAA, provocan directamente o por desplazamiento de la pauta de lectura la aparición de tripletes de terminación y por tanto,

es presumible que la síntesis de proteínas de menor peso molecular, o no se produzca o genere proteínas inestables, lo que conlleva su degradación, todo ello compatible con la ausencia de actividad fosforilasa en los pacientes correspondientes.

Un hecho destacable, ha sido la descripción de una mutación del tipo inserción/delección en el gen *PYGM* (387 insA/del 8pb) (221). Lo más interesante de esta mutación es el mecanismo mutagénico causal de la misma. Teniendo en cuenta los trabajos sobre la influencia que tiene el ambiente nucleotídico de la zona de la mutación en la mayor probabilidad de ocurrencia de mutaciones, desarrollados por Cooper y Krawzack (222, 223) y gracias a su colaboración, se ha propuesto un posible mecanismo que explique la génesis de dicha mutación. Según estos autores dicha mutación puede deberse a que el fragmento deleciónado (5-TGGCCGGT-3'), que se denomina "elemento simétrico", puede provocar la formación de una estructura "tipo Moebius" durante la síntesis de ADN, lo que conduciría a la delección de dicho elemento. Posteriormente se produciría la inserción de la adenina mediante un mecanismo de "deslizamiento por desapareamiento" ("slipped-mispairing") en el que estaría implicada la presencia de la secuencia "repetida directa" ("direct repeat") 5'GC...GC-3' (Fig. 57).

Dentro del genotipaje de pacientes con enfermedad de McArdle, es la primera vez que se describe un enfermo con dos mutaciones, R193W y 794/795 delAA, ambas potencialmente patogénicas, en homocigosis (218). El paciente no mostró actividad de MPL. La mutación R193W lleva aparejada la sustitución de un residuo polar por un aminoácido aromático, la Arg-193, que posee un alto grado de conservación en la escala filogenética (28) y además es un residuo con dos funciones dentro de la proteína, (a) de unión a glucosa-6-P, y (b) es un residuo que forma "pares de contacto entre dímeros", interactuando con los residuos Leu-39, Val-40 y Lys-41 de la otra subunidad en el contexto de la red de residuos asociada con el control alostérico de la glucosa-6-P (28). Por tanto, dicha mutación afectaría presumiblemente a la unión de este efector de la MPL, y a su control alostérico. Entre todas las mutaciones descritas en el gen *PYGM*, únicamente la mutación L291P (67) provoca una alteración de pares de contacto entre dímeros. El aminoácido Leu-291 pertenece a otra red, la denominada "tower helix and gate loop" (28) implicada en el control alostérico del centro activo. Por otra parte, la mutación 794/795 delAA, como se ha comentado previamente, produce un desplazamiento del código de lectura que conlleva la aparición de un codón de terminación, lo que predice la síntesis de una proteína deleciónada en 29 aminoácidos, siendo la mutación más terminal hacia el extremo carboxilo hasta ahora identificada. El

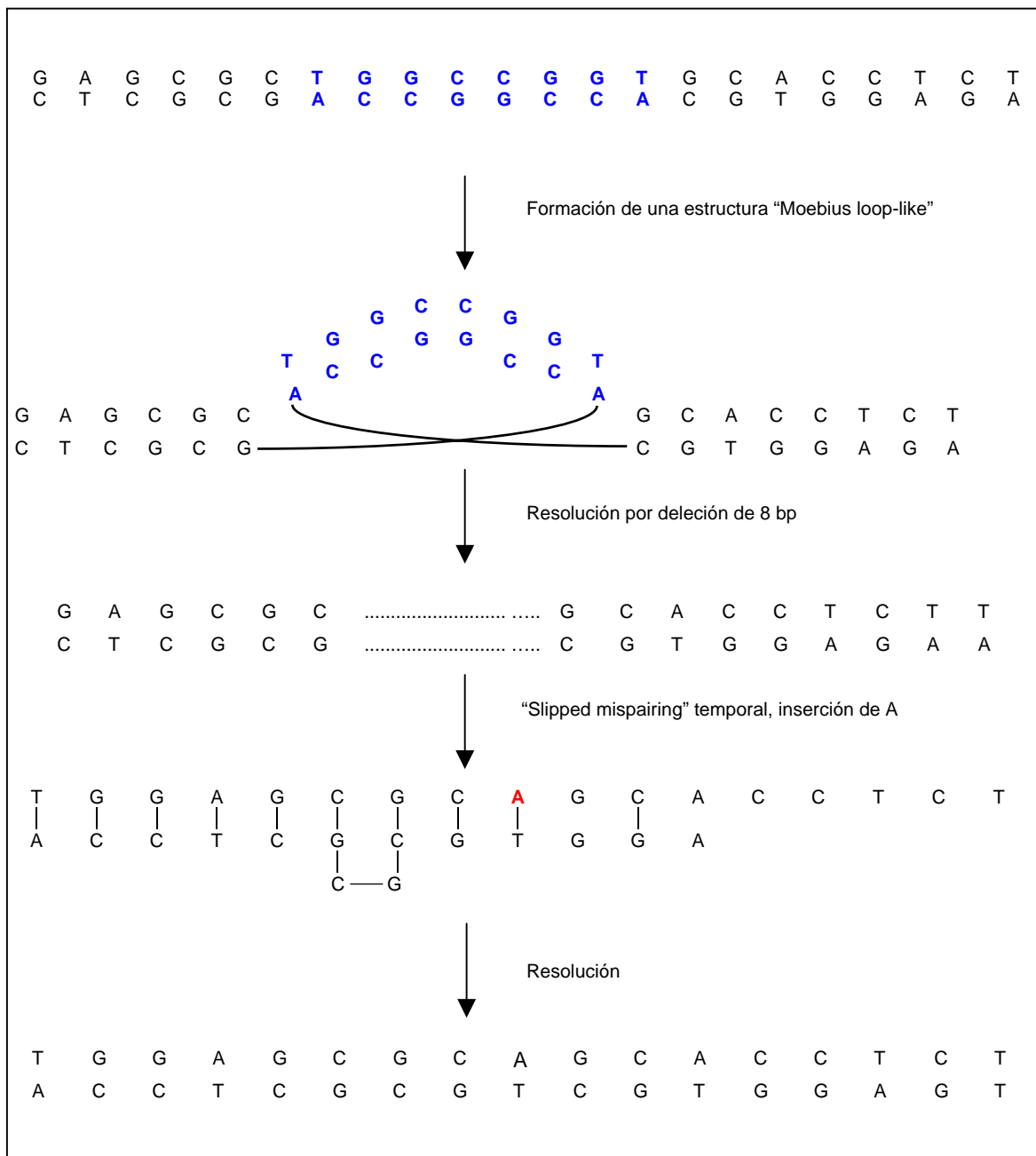


Figura 57. Mecanismo mutagénico propuesto para la mutación 387 insA/del 8pb.
 En azul el octanucleótido simétrico deleciónado. En rojo la adenina insertada.

dominio C-terminal de la MPL se encuentra bastante conservado en varias especies y diferentes isoenzimas, y parece ser importante para su función a pesar de no estar involucrado directamente en la unión de sustratos o en la regulación de la actividad enzimática (224). En concordancia con estos datos, Kubisch y cols. (73) describieron una deleción de una base en el exón 18 (753 delA), que posteriormente ha sido encontrada

en 3 sujetos de esta tesis, la cual conduce a la delección de 89 aminoácidos de la porción C-terminal de la MPL. Además, Tan y cols. (225) han descrito en una oveja con enfermedad de McArdle una mutación en un lugar de “splicing” que provocaba la eliminación de los últimos 39 aminoácidos de la MPL.

Todas las mutaciones “de sentido equivocado” que se han identificado por primera vez en esta tesis, se encontraron en pacientes sin actividad enzimática de MPL y son (aparte de W797R y R193W): (i) La sustitución R323G, en una posición aminoacídica que se encuentra moderadamente conservada en la escala filogenética, pero que implica un cambio drástico de polaridad que puede alterar la conformación protéica y la unión del activador AMP (28). (ii) La mutación E348K, donde Glu-348 está totalmente conservado en varias glucógeno fosforilasas (28). La sustitución es de un residuo ácido por otro básico y se encuentra en las proximidades de varios residuos implicados en la unión al glucógeno (28). (iii) La alteración T487N (226) se ha observado en dos hermanos en heterocigosis compuesta con R49X. La Tyr-487 es un residuo idéntico en fosforilasas de distintas especies, y se encuentra al comienzo del dominio C-terminal cerca de sitios de unión al cofactor piridoxal fosfato y a residuos de unión a glucosa (28). Es de reseñar, que Tsujino y cols. (227) han identificado la mutación R489W en una secuencia altamente conservada en un toro con déficit de MPL. (iv) En la mutación R601W, la Arg-601 es un aminoácido idéntico en varias fosforilasas de distintas especies excepto en la de levadura que es lisina (también básico). La sustitución por un aminoácido aromático podría provocar alteraciones de la estructura de la MPL, y además se localiza entre dos zonas implicadas en la unión de piridoxal fosfato y glucosa. Es interesante remarcar que dicha mutación es la tercera descrita en esta tesis que produce una sustitución R↔W (W797R, R193W y R601W). (v) De la alteración A659D (228) hay que decir que Ala-659 es un residuo idéntico en varias fosforilasas de la escala filogenética (28) y provoca la aparición de un residuo ácido en lugar de uno neutro que está situado cerca de sitios de unión a piridoxal fosfato y glucosa. (vi) En la sustitución A703V, Ala-703 se encuentra formado parte de una secuencia de 20 aminoácidos totalmente conservada en las fosforilasas humanas y de rata (28), y aunque dicha mutación no produce aparentemente un cambio drástico de las características de hidrofobicidad del residuo, su potencial patogenicidad puede ser debida a una alteración en la estructura de la MPL que conduzca a la ausencia de actividad MPL en músculo del paciente (que en el otro alelo llevaba la R49X).

Este estudio ha contribuido con dos nuevas mutaciones (A659D y A703V) y con un nuevo caso homocigoto para la mutación 5'ivs14 g→a, a la posible existencia de

“regiones calientes” (“hot-spots”), es decir, regiones más susceptibles a mutaciones en el gen *PYGM*. Así, puede observarse un mayor número de mutaciones en el exón 14/intrón 14 con cuatro mutaciones (E540X, K542T, R575X e 5'ivs14 g→a) y especialmente, en el exón 17 con seis mutaciones (A659D, Q665E, N684Y, G685R, A703V y 708/709 delTTC).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio bioquímico-genético de pacientes con enfermedad de McArdle, se desprende que existe una gran heterogeneidad genético-molecular en la población española, y que ciertas mutaciones, tales como la W797R, pueden ser lo que se denominan “privadas”, es decir, sólo se producen en ciertas poblaciones, en este caso la española (219, 220), de la misma manera que ocurre en la población japonesa con la mutación 708/709 delTTC (70). Además, se puede deducir que para realizar un diagnóstico de la enfermedad podría utilizarse sangre como muestra de elección en una primera fase diagnóstica, estudiando las mutaciones frecuentes R49X, W797R, G204S y 753delA mediante métodos sencillos, rápidos, fiables y económicos tipo PCR-RFLP, seguida de una segunda línea de actuación de análisis de las secuencias que incluyan el exón 14 y el exón 17 y sus zonas vecinas mediante un proceso algo más laborioso de secuenciación directa, pero en el que revisamos la presencia de 11 mutaciones. Si tras este análisis no se consigue diagnosticar al paciente se ha de proceder a la obtención de una biopsia muscular, en la cual se determinaría histológica y bioquímicamente la actividad MPL, que en caso de deficiencia, daría paso a la secuenciación completa del gen *PYGM* si se requiere llegar a la identidad molecular de la enfermedad, un proceso más largo, caro y laborioso.

2. Deficiencia de fosfofructoquinasa muscular

El déficit de PFK produce una miopatía metabólica en principio indistinguible clínicamente de la enfermedad de McArdle. El gen que codifica la PFK, *PFKM*, ha sido clonado, secuenciado y asignado al cromosoma 12q13 (94-96). Hasta el momento se han identificado 20 mutaciones en las regiones codificantes o en los lugares de unión intrón/exón del gen, lo que revela una gran heterogeneidad molecular de la enfermedad. En este estudio se han encontrado 6 pacientes con déficit de PFK, tres de los cuales no presentaban actividad y los otros tres con actividades alrededor del 50% del valor de decisión diagnóstica. Estos datos bioquímicos coincidieron, respectivamente, con ausencia de reacción histoquímica o con una reacción poco intensa, calificada por los

neuropatólogos como pálida. Ya que ninguna mutación era mucho más frecuente que las demás, no se pudo realizar un cribado mutacional racional en estos pacientes, y por tanto, el análisis molecular se dirigió hacia el estudio de la mutación R39P por dos motivos: (i) había sido descrita en un paciente italiano (100) con la posibilidad de un origen étnico similar en españoles, y (ii) porque dicha mutación se encontró además en otro paciente italiano junto a la mutación Q12X del gen que codifica la MADA (108), lo que animó a buscar el mismo doble fallo genético en estos pacientes. Sin embargo, dicha alteración no se halló en ningún alelo de estos 6 pacientes. El estudio molecular de todo el gen no es objetivo de esta tesis debido a que posee 24 exones y por el pequeño número de pacientes. Dicho estudio podría formar parte de otro proyecto en el cual se incluyera el análisis molecular en la población española de otras intolerancias al ejercicio menos frecuentes como las glucogenosis distales.

Ya que clínicamente este déficit es semejante a la enfermedad de McArdle, los clínicos deberían buscar ciertos hallazgos diferenciales, principalmente en lo que respecta a la afectación de los eritrocitos (84,85): anemia regenerativa con reticulocitosis, hiperbilirrubinemia, etc; de forma que se evitara en parte el cribado en sangre de mutaciones relacionadas con la enfermedad de McArdle (siempre teniendo en mente que este último trastorno es más frecuente que el déficit de PFK muscular), aunque en caso de duda, debe practicarse la biopsia muscular para demostrar el defecto bioquímico.

3. Deficiencia de mioadenilato desaminasa

El déficit de MADA puede producir una miopatía metabólica relacionada con el ejercicio, un hecho que suscita debate actualmente. El gen que codifica la MADA, *AMPD1*, ha sido clonado, secuenciado y asignado al cromosoma 1p21-23 (134,139). Hasta el momento únicamente se ha identificado la mutación Q12X (141), la cual se encuentra en la gran mayoría de los pacientes con déficit de MADA, aunque probablemente se describirán en un tiempo breve nuevas mutaciones asociadas a este déficit en ese otro pequeño porcentaje de pacientes (143). Por ello, se decidió que el estudio de la intolerancia al ejercicio por déficit de MADA se realizara solamente a nivel molecular, teniendo en cuenta que la prueba de amonio en isquemia es muy útil en el diagnóstico de este déficit y que además se cuenta con una reacción histoquímica fiable que demuestra el defecto enzimático en músculo esquelético.

En adelante se discuten los resultados obtenidos centrándose en el objetivo número 6 de esta tesis, que es evaluar las consecuencias fenotípicas de la mutación Q12X del gen *AMPD1*.

Se encontraron seis pacientes con deficiencia MADA demostrada histoquímicamente, siendo todos ellos homocigotos para la mutación Q12X (229). Tres de ellos probablemente sólo tienen deficiencia de MADA (déficit congénito sintomático) teniendo en cuenta que sus síntomas son moderados. Dos presentaron además la mutación R49X del gen *PYGM* en homocigosis, y el otro mostró una asociación con la mutación A3243G del ADN mitocondrial (déficits congénitos coincidentes) (126).

Se observó que la frecuencia de heterocigosis para la mutación Q12X en la población española se situaba alrededor del 17%. Por tanto, no resulta extraño que el 1,5% (6 de 400) de las biopsias musculares remitidas al Hospital “12 de Octubre” de Madrid fueran deficientes en MADA. Estos datos concuerdan con los descritos por otros autores (116,141,144).

En consistencia con datos de la literatura (141,144) los tres pacientes con un déficit único de MADA, que fueron homocigotos para Q12X, mostraron un fenotipo moderado con mialgias y calambres relacionados con el ejercicio, sin episodios de mioglobinuria. El paciente 4, que presentó la mutación Q12X en homocigosis junto con niveles de heteroplasmia de la mutación tipo “MELAS” A3243G del ADN mitocondrial, tenía un fenotipo claro compuesto por diabetes mellitus de herencia materna más oftalmoplejía externa progresiva (PEO) asociada con la mutación MELAS (230). Aunque es algo sorprendente, este paciente no mostró debilidad de los músculos de la extremidades, lo cual sugiere que la asociación de la deficiencia de MADA y la mutación tipo MELAS no parece afectar el fenotipo PEO/MELAS (231). Sin embargo, dado que la severidad de la expresión clínica de las mutaciones en el ADN mitocondrial es por su naturaleza muy variable, y que ésta se debe a diferentes grados de heteroplasmia (porcentaje de ADN mitocondrial mutado) en cada tejido, sería difícil comparar el impacto sobre el fenotipo PEO/MELAS de un trastorno autosómico recesivo moderado como la deficiencia de MADA.

Los pacientes 5 y 6 fueron homocigotos para la mutación Q12X del gen *AMPD1* y para la mutación R49X del gen *PYGM*, que son los denominados “doble fallo genético”, siendo uno de ellos el segundo caso descrito en la literatura (232). El primero de ellos tenía la presentación clínica típica de la enfermedad de McArdle, mientras que el último mostró una clínica más severa de lo habitual con episodios de mioglobinuria a edad temprana. Aunque la deficiencia de MADA podría jugar un papel en la severidad de los

síntomas miopáticos del paciente 6, el hecho de que en el paciente 5 no se evidencia dicho papel y de que ambos sean homocigotos para la misma mutación, R49X, en el gen *PYGM* sugiere que el impacto clínico de la deficiencia de MADA sobre la enfermedad de McArdle puede ser nulo. Haller y cols.(123) refirieron que la asociación de deficiencias de MPL y MADA no produce un empeoramiento adicional en la función muscular respecto a pacientes únicamente con pura enfermedad de McArdle. Tsujino y cols. (233) identificaron el primer paciente con deficiencia de MADA y MPL, con las mutaciones Q12X y R49X en homocigosis, y Bruno y cols. (108) describieron un paciente con defectos combinados de MADA y PFK muscular, cuyas características clínicas, en ambos casos, fueron más severas que aquellas habitualmente presentes en los déficits individuales. Por tanto, hay cierta incertidumbre sobre si la coexistencia de dos trastornos congénitos (deficiencia de MADA congénita adquirida (123)) contribuye o no a un fenotipo severo.

Los datos aquí mostrados confirman que la deficiencia de MADA *per se* (déficit congénito sintomático (123)) tiene efectos sutiles sobre el metabolismo muscular, provocando fenotipos moderados (123,144). Así se puede deducir que la mutación Q12X posiblemente produzca un efecto clínico moderado, que dicha mutación es frecuente en la población española, y por ello, frecuentemente asociada con otras enfermedades metabólicas, y que el efecto clínico de la combinación de las deficiencias de MADA y MPL parece ser nulo.

3. Deficiencia de carnitina-palmitil transferasa.

El fenotipo muscular del adulto producido por un déficit de CPT II se caracteriza por intolerancia al ejercicio con ataques recurrentes de mialgias, calambres, rigidez muscular y desarrollo de debilidad. La presencia de mioglobinuria es más frecuente en esta patología que en otras deficiencias enzimáticas asociadas con intolerancia al ejercicio (33,44). En los periodos intercríticos los pacientes suelen ser asintomáticos. El tipo de ejercicio que precipita los síntomas, en general, es de larga duración, y se considera el trastorno más común del metabolismo lipídico que afecta al músculo esquelético. El gen humano que codifica para CPT II (*CPT2*) ha sido clonado, secuenciado y asignado a la región cromosómica 1p32 (171,174,188). Hasta ahora se han descrito 21 mutaciones en el gen *CPT2* asociadas con distintos fenotipos, adulto muscular (la mayoría), neonatal e infantil.

Como ocurrió en la enfermedad de McArdle, la proporción de mujeres es similar a la de varones en este estudio (8 varones y 10 mujeres), lo que difiere con otros datos de la literatura (6,44) dónde el porcentaje de varones afectados era mayor.

Las mutaciones presentes en los pacientes de este estudio deben inducir cambios estructurales en la proteína enzimática que impidan una correcta función catalítica, a juzgar por los valores de actividad residual obtenidos por el método de intercambio isotópico y por la fracción insensible a malonil-CoA obtenida con el método "forward". Por tanto, como en todos los pacientes en que se realizó la determinación bioquímica se caracterizaron los dos alelos potencialmente patogénicos de la enfermedad, se desprende que la fiabilidad analítica de ambos métodos de determinación de actividad de CPT resultan adecuados para la detección de pacientes con este déficit enzimático.

Histológicamente, únicamente el paciente 1 mostró depósitos lipídicos y en el resto no se encontraron hallazgos relevantes, hecho que concuerda con los hallazgos de otros autores (6,44) y que debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial con el déficit de carnitina. Dicha histología anodina y la ausencia de una reacción histoquímica para CPT II, provoca que muchos de los pacientes con síntomas inespecíficos de miopatía metabólica se deriven hacia el estudio bioquímico de esta enzima, lo que ha sido puesto de manifiesto en esta tesis, ya que de 150 pacientes en los que se sospechaba clínicamente un posible déficit de CPT, solamente alrededor de un 10% presentaron déficit enzimático. Este dato indica que debe realizarse una cuidadosa anamnesis clínica del enfermo poniendo especial cuidado en el tipo y características del ejercicio, en ciertos agentes precipitantes de las crisis (frio, medicamentos, etc.), en la determinación de la actividad CK sérica en reposo y durante la crisis, en la observación de la presencia de mioglobinuria (el 87% de los casos en esta serie) y en la edad de comienzo de los síntomas, para ajustar más las sospechas clínicas antes de practicar una biopsia muscular.

La mutación predominante en la deficiencia de CPT II del adulto es la S113L. Taroni y cols. (191) encontraron esta mutación en el 80% de un grupo de 25 pacientes de origen italiano, de los cuales 8 fueron homocigotos y 12 heterocigotos. Zierz y cols. (200) describieron que el 88% de 22 pacientes alemanes presentaban la mutación (8 homocigotos y 12 heterocigotos). Recientemente, Kauffman y cols. (201) observaron la mutación en el 95% de una serie de 20 pacientes norteamericanos, de los cuales 5 fueron homocigotos y 14 heterocigotos. En este estudio de 16 pacientes, 14 presentaron la mutación, lo que representa el 87%, de los cuales 10 llevaban la mutación en sus dos alelos y 4 eran heterocigotos (234, 235). Aunque la proporción de pacientes que

presentaban la mutación en al menos un alelo es similar a otras series, la distribución de dichos alelos es significativamente diferente, es decir, la proporción de pacientes homocigotos (63%) es mayor al compararla con porcentajes de homocigosidad del 25%-36% en las series previamente descritas (191, 200, 201). Por otra parte, todos los alelos que llevaban la mutación S113L presentaban además los dos polimorfismos descritos por Taroni y cols. (191) V368I y M647V, es decir presentaban el alelo ILV, en concordancia con sus resultados.

La mutación P50H, encontrada por Verdiero y cols.(188) en cuatro pacientes de origen europeo formando parte del alelo IHM, únicamente se encontró en heterocigosis en un paciente de esta tesis y formando parte del mismo alelo IHM (235).

El análisis de secuenciación reveló la presencia de dos mutaciones previamente descritas en otros pacientes con deficiencia de CPT. Una de ellas fue la alteración genotípica 178 insT/del 25pb (189) previamente asociada a fenotipo adulto y neonatal, que se encontró en el paciente 11 de la tabla XIX de esta tesis en heterocigosis compuesta con la mutación P50H (235); la otra alteración fue la mutación sin sentido R124X, descrita en otro paciente con fenotipo adulto (192) y que formaba parte de una heterocigosis compuesta con S113L en el paciente 16 de la tabla XIX, de igual modo que en el paciente descrito por Yang y cols (192).

La potencial patogenicidad de las nuevas mutaciones que se encontraron en los pacientes con déficit de CPT II se evaluó de forma semejante a como se realizó en la enfermedad de McArdle: ausencia en 100 controles, déficit de actividad enzimática, única alteración genotípica en el alelo correspondiente excepto los polimorfismos V368I y M647V, y valoración de las consecuencias fisiopatológicas derivadas de la alteración molecular.

La mutación 36/38 insGC, es una microlesión que produce el desplazamiento de la pauta de lectura con aparición de un codon stop en el residuo 73. Dicha alteración causará la síntesis de una proteína de 72 aminoácidos en lugar de 658, que será probablemente muy inestable y sensible a la degradación por proteasas. Es la mutación más cercana al extremo N-terminal hasta ahora descrita, y la segunda alteración molecular que se localiza en el exón 1 (235).

La mutación Y120C reemplaza a un aminoácido aromático voluminoso, tirosina, por uno polar pequeño, cisteína. La Tyr-120 se encuentra estrictamente conservada en todas las acil-transferasas de diferentes especies y forma parte de una región de 19 aminoácidos (nº 103-121) que se encuentra conservada completamente en las enzimas de rata, ratón y humanas (157, 171) (Fig. 58). Este dato es consistente con un papel

crucial para este aminoácido en la función normal de la CPT II. El alelo Cys-120 presenta los polimorfismos V368I y M647V, de igual manera que la mutación S113L. Esta sustitución se localiza cerca de la mutación predominante en estos pacientes, S113L (235).

	103	110	120
Humano CPT-II	D K Q N K H T S Y I S G P W F - D - M - Y L		
Ratón CPT-II	D K Q N K H T S Y I S G P W F - D - M - Y L		
Rata CPT-II	D K Q N K H T S Y I S G P W F - D - M - Y L		
Humano M-CPT-I	- K S W W A S N Y V S D W W E - E Y I - Y L		
Rata M-CPT-I	- K S W W A T N Y V S D W W E - E Y V - Y L		
Humano L-CPT-I	- K S W W A T N Y V S D W W E - E Y I - Y L		
Rata L-CPT-I	- K S W W A T N Y V S D W W E - E Y I - Y L		
Humano CAT	- R A R K T E N W L S E W W L K T - A - Y L		
Rata CAT	- R A R K T E N W L S E W W L K T - A - Y L		
Humano COT	E R A K G K R N W L E E W W L - N - V A Y L		
Rata COT	E R A K G K R N W L E E W W L - N - V A Y L		
Humano ChAT	E R Q E K T A N W V S E Y W L N D - M - Y L		
Rata ChAT	E R Q E K T A N W V S E Y W L N D - M - Y L		

Figura 58. Grado de conservación de la Tyr-120 en diferentes acil-transferasas de la escala filogenética.

CPT: carnitina-palmitil transferasa, CAT: carnitina-acetil transferasa, COT: carnitina-octanil transferasa, ChAT: colina-acetil transferasa, M: muscular, L: hepática.

La mutación I502T conduce a la sustitución de un residuo hidrofóbico, isoleucina, por uno polar, treonina, dentro de una región de aminoácidos conservada completamente en las enzimas de humanos y de rata (157,171) (Fig. 59). En la M-CPT I y la L-CPT I, este aminoácido es valina, cuya estructura e hidrofobicidad es similar a la de leucina (157). El alelo Thr-502 presenta el polimorfismo V368I pero no el M647V, de manera similar a la mutación P50H. Además, esta sustitución se halla junto a la mutación recientemente descrita por Taggar y cols, R503C, en tres pacientes con el fenotipo del adulto. Es de destacar que dicha alteración aparece en heterocigotos simples, pudiendo ser una mutación dominante. Dicha alteración produce el reemplazo de un aminoácido polar, arginina, por un aminoácido con grupo tiol, cisteína, lo que podría provocar graves consecuencias funcionales o estructurales, incluso en heterocigosis. En comparación con R503C, la mutación I502T produciría cambios menos severos en la estructura primaria de la CPT II, y así probablemente, únicamente provocaría síntomas musculares si ambos alelos llevan la mutación (235).

Las mutaciones Y120C e I502T se localizan en el exón 4, el mayor de los 5 exones del gen *CPT2* (188), el cual presenta la mayoría de la mutaciones descritas hasta el momento (Fig. 51).

	492	500	506
Humano CPT-II	A A F K H G R T E T I R P A S		
Ratón CPT-II	A A F K H G R T E T I C P A S		
Rata CPT-II	A A F K H G R T E T I R P A S		
Humano M-CPT-I	R M F R E G R T E T V R S C T		
Rata M-CPT-I	R M F R E G R T E T V R S C T		
Humano L-CPT-I	R L F R E G R T E T V R - - S		
Rata L-CPT-I	R L F R E G R T E T V R S C T		
Humano CAT	R M F H L G R T D T I R S A S		
Rata CAT	R M F H L G R T D T I R S A S		
Humano COT	R H F Y H G R T E T M R S C T		
Rata COT	R Y F Y H G R T E T V R S C T		
Humano ChAT	R R F Q E G R V D N I R S A T		
Rata ChAT	R R F Q E G R V D N I R S A T		

Figura 59. Grado de conservación de la Ile-502 en diferentes acil-transferasas de la escala filogenética.

CPT: carnitina-palmitil transferasa, CAT: carnitina-acetil transferasa, COT: carnitina-octanil transferasa, ChAT: colina-acetil transferasa, M: muscular, L: hepática.

Las tres nuevas mutaciones encontradas en esta tesis confirman la heterogeneidad genética del déficit de CPT II. Sin embargo, considerando que la mutación S113L es la predominante a gran distancia del resto (87% de los pacientes) y con un alto grado de homocigosis (63% de los pacientes), ésta podría utilizarse como primera línea de diagnóstico de esta enfermedad a partir de ADN extraído de una muestra de sangre mediante un método sencillo y rápido de PCR-RFLP, dejando la práctica de una biopsia muscular para confirmar el diagnóstico bioquímico únicamente en aquellos casos en los que el resultado de la prueba anterior fuera negativo.

CONCLUSIONES

1. En homogenado muscular las actividades enzimáticas de decisión diagnóstica fueron $15,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g tejido}^{-1}$ para miofosforilasa, $20,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g tejido}^{-1}$ para fosfofructoquinasa y $0,21 \text{ nmol min}^{-1} \text{mg NCP}^{-1}$ para carnitina-palmitil transferasa.
2. Todos los pacientes con ausencia de tinción histoquímica de miofosforilasa o fosfofructoquinasa presentaron niveles indetectables de actividad enzimática en músculo. 14 pacientes de 150 analizados (9,3%) con sospecha clínica de déficit de carnitina-palmitil transferasa mostraron actividades enzimáticas por debajo del nivel de decisión diagnóstica. Se han encontrado 6 pacientes con ausencia de tinción histoquímica de mioadenilato desaminasa que resultaron homocigotos para la mutación Q12X. Esta mutación produce *per se* un cuadro clínico muscular leve. Cuando se asocia a otras alteraciones metabólicas puede producirse un incremento en la expresión fenotípica.
3. Todos los pacientes con enfermedad de McArdle han sido caracterizados molecularmente. Las mutaciones más frecuentes fueron R49X, W797R, G204S y 753delA, representando el 56%, 8%, 7% y 4%, respectivamente, del total de los alelos del gen *PYGM*.
4. Se han encontrado 13 nuevas mutaciones en el gen *PYGM* que cumplieron los criterios de patogenicidad establecidos: 8 “de sentido equivocado”, 2 “sin sentido” y 3 “fuera de fase”.
5. Se han caracterizado molecularmente todos los pacientes con déficit de carnitina-palmitil transferasa II, siendo la mutación más frecuente la S113L, lo que representa el 75% del total de los alelos del gen *CPT2*.
6. Se han encontrado 3 nuevas mutaciones en el gen *CPT2* que cumplieron los criterios de patogenicidad establecidos: 2 “de sentido equivocado” y 1 “fuera de fase”.
7. Para todas las nuevas mutaciones encontradas en los genes *PYGM* y *CPT2* se han diseñado métodos de PCR-RFLP aplicables al laboratorio clínico.

8. No se han podido caracterizar genético-molecularmente a los pacientes con déficit de fosfofructoquinasa.
9. En pacientes con episodios repetitivos de rabdomiolisis asociados con el ejercicio de larga duración, el frío o infecciones, y con un incremento de la actividad sérica de creatín quinasa se debe realizar diagnóstico molecular en sangre de la mutación S113L del gen *CPT2*, siendo un método no invasivo.
10. En pacientes con intolerancia al ejercicio que presenten una prueba de ejercicio isquémico sin aumento de la producción de lactato se debe realizar diagnóstico molecular directo en sangre de las mutaciones R49X, W797R, G204S y 753 delA del gen *PYGM*, lo que representa en su conjunto el 75% de los alelos. Como segunda línea en el proceso diagnóstico deberían analizarse en sangre las secuencias de los exones 14 y 17 del gen *PYGM*, antes de proceder a la obtención de una biopsia muscular.
11. En pacientes con intolerancia al ejercicio, con actividad sérica moderada de creatín quinasa en reposo y que además presenten una prueba de ejercicio isquémico sin aumento de la producción de amonio debe realizarse diagnóstico molecular en sangre de la mutación Q12X del gen *AMPD1*.

BIBLIOGRAFÍA

1. **DiMauro S, Tsujino S.** Nonlysosomal glycogenoses. En: Engel AG, Franzini-Amstrong C (Eds): *Myology 2ª Ed.* New York, McGraw-Hill. **1995**, pgs. 1554-1576.
2. **Gross M.** Clinical heterogeneity and molecular mechanisms in inborn muscle AMP deaminase deficiency. *J Inher Metab Dis* **1997**; 20:186-192.
3. **Layzer RB.** How muscles use fuel. *N Engl J Med* **1991**; 324:411-412.
4. **Havel RJ.** Influence of intensity and duration of exercise on supply and use of fuels. *Adv Exp Med Biol* **1971**; 11:315-325.
5. **Felig P, Wahren J.** Fuel homeostasis in exercise. *N Engl J Med* **1975**; 293:1078-1084.
6. **Di Donato S.** Disorders of lipid metabolism affecting skeletal muscle: Carnitine deficiency syndromes, defects in the catabolic pathway, and carnitin disease. En: Engel AG, Franzini-Amstrong C (Eds): *Myology 2ª Ed.* New York, McGraw-Hill. **1995**, pgs. 1587-1609.
7. **Havel RJ.** Caloric homeostasis and disorder of fuel transport. *N Engl J Med* **1972**; 287:1186-1192.
8. **Layzer RB.** Muscle metabolism during fatigue and work. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **1990**; 4:441-459.
9. **Arenas J, Ricoy JR, Encinas ER et al.** Carnitine in muscle, serum and urine of non-professional athletes: Effects of physical exercise, training, and L-carnitine administration. *Muscle & Nerve* **1991**; 14:598-601.
10. **McArdle B.** Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin Sci* **1951**; 10:13-35.
11. **Schmidt R, Hammaker L.** Hereditary absence of muscle phosphorylase (McArdle's syndrome). *N Engl J Med* **1961**; 264:223-226.
12. **Tarui S, Okuno G, Ikura Y, Tanaka T, Suda M, Nishikawa M.** Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle: A new type of glycogenosis. *Biochem Biophys Res Commun* **1965**; 19:517-523.
13. **DiMauro S, Melis-DiMauro P.** Muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* **1973**; 182:929-931.
14. **Zierz S.** Carnitine palmitoyltransferase deficiency. En: Engel AG, Franzini-Amstrong C (Eds): *Myology 2ª Ed.* New York, McGraw Hill. **1994**, pgs. 1577-1586.
15. **Fishbein WN, Armbrustmacher VW, Griffin JL.** Myoadenylate deaminase deficiency: A new disease of muscle. *Science* **1978**; 299:545-548.
16. **Fishbein WN.** Myoadenylate deaminase deficiency. En: Engel AG, Banker BQ (Eds): *Myology.* New York, McGraw Hill. **1986**, pgs. 1745-1762.

17. **Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, et al.** Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* **1999**; 341:1037-1044.
18. **Haller RG.** Treatment of McArdle disease. *Arch Neurol* **2000**; 57:923-924.
19. **Rubio JC, Martin MA, del Hoyo P, Bustos F, Campos Y, Arenas J.** Déficit de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial. *Rev Neurol* **1998**; 26 (Supl1):S15-S20.
20. **Martin MA, Campos Y, Bustos F, del Hoyo P, Rubio JC, Arenas J.** Genética molecular de las alteraciones de la cadena respiratoria mitocondrial. *Rev Neurol* **1998**; 26 (Supl1):S27-S35.
21. **Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, Di Mauro S.** The molecular genetic basis of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Muscle Nerve* **1995**; Suppl 3:S23-S27.
22. **Bresolin N, Miranda AF, Jacobson MP et al.** Phosphorylase isoenzymes of human brain. *Neurochem Pathol* **1983**; 1:171.
23. **Servidei S, DiMauro S.** Disorders of glycogen metabolism. *Neurologic Clinics* **1989**; 7:159-178.
24. **Sato K, Imai F, Hatayama I, Roleofs RI.** Characterization of glycogen phosphorylase isoenzymes present in cultured skeletal muscle from patients with McArdle disease. *Biochim Biophys Res Commun* **1977**; 78:663-668.
25. **DiMauro S, Arnold S, Miranda AF, Rowland LP.** McArdle disease: The mystery of reappearing phosphorylase activity in muscle culture. A fetal isoenzyme. *Ann Neurol* **1978**; 3:60-66.
26. **Guinovart JJ.** Metabolismo del glucógeno y su regulación. En: Herrera E (Ed): *Bioquímica 2ª Ed.* Madrid, Interamericana-McGraw Hill. **1991**, pgs. 529-556.
27. **Fletcherick RJ, Madsen NB.** The structures and related functions of phosphorylase a. *Ann Rev Biochem* **1980**; 49:31-61.
28. **Hudson JW, Golding GB, Crerar MM.** Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J Mol Biol* **1993**; 234:700-721.
29. **Mommaerts WF, Illinworth B, Pearson CM, Guillory RJ, Seraydarian KA.** A functional disorder of muscle associated with the absence of phosphorylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **1959**; 45:791-797.
30. **Schmidt R, Mahler R.** Chronic progressive myopathy with myoglobinuria. Demonstration of a glycogenolytic defect in the muscle. *J Clin Invest* **1959**; 38:2044-2058.

31. **DiMauro S, Servidei S, Tsujino S.** Disorders of carbohydrate metabolism: Glycogen Storage diseases. En: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL (Eds): *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease 2ª Ed.* Boston, Butterworth-Heinemann. **1996**, pgs. 1067-1097.
32. **Braakhekke JP, Bruin MI, Stegeman DF, Wevers RA, Binkhorst RA, Joosten EM.** The second wind phenomenon in McArdle's disease. *Brain* **1986**; 109:1087-1101.
33. **Tonin P, Lewis P, Servidei S, DiMauro S.** Metabolic causes of myoglobinuria. *Ann Neurol* **1990**; 27:181-185
34. **Engel WK, Eyerman EL, Williams HZ.** Late-onset type of skeletal muscle phosphorylase deficiency: A new familial variety with completely and partially affected subjects. *N Engl J Med* **1963**; 268:135
35. **Pourmand R, Sanders DB, Corwin HM.** Late-onset McArdle's disease with unusual electromyographic findings. *Arch Neurol* **1983**; 40:374-397.
36. **DiMauro S, Hartlage P.** Fatal infantile form of muscle phosphorylase deficiency. *Neurology* **1978**; 28:1124-1129.
37. **De La Maza M, Patten BM, Williams JC, Chambers JP.** Myophosphorylase deficiency: A new cause of infantile hypotonia simulating infantile muscular atrophy. *Neurology* **1983**; 33:1383-1387.
38. **Milstein JM, Herron TM, Haas JE.** Fatal infantile phosphorylase deficiency. *J Child Neurol* **1989**; 4:186-188.
39. **DiMauro S, Bresolin N.** Phosphorylase deficiency. En: Engel AG, Banker BQ (Eds): *Myology.* New York, McGraw-Hill. **1986**, pgs.1585-1601.
40. **Bale P, Hammett JF, Neale FC.** Histopathology of McArdle's disease in a family. *J Pathol Bacteriol* **1967**; 94:293.
41. **Takeuchi T, Kuriaki H.** Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J Histochem Cytochem* **1955**; 3:153.
42. **Feit H, Brooke M.** Myophosphorylase deficiency: Two different molecular etiologies. *Neurology* **1976**; 26:963-967.
43. **Mitsumoto H.** McArdle disease: Phosphorylase activity in regenerating muscle fibers. *Neurology* **1979**; 29:258-262.
44. **Di Mauro S, Papadimitriou A.** Carnitine palmitoyltransferase deficiency. En: Engel AG, Banker BQ (Eds): *Myology.* New York, McGraw-Hill. **1986**, pgs. 1697-1708
45. **Tsujino S, Nonaka I, DiMauro S.** Glycogen storage myopathies. *Neurologic Clinics of North America* **2000**;18:125-150.

46. **Felig P, Wahren J.** Amino acid metabolism in McArdle's syndrome. *N Eng J Med* **1973**; 288:774-777.
47. **Lewis SF, Haller RG.** The pathophysiology of McArdle's disease: clues to regulation in exercise and fatigue. *J Appl Physiol* **1986**; 61:391-401.
48. **Ruff RL, Weissman J.** Iodoacetato-induced contracture in rat skeletal muscle: Possible role of ADP. *Am J Physiol* **1991**; 261:828-836.
49. **Haller RG, Clausen T, Vissing J.** Reduced levels of skeletal muscle Na⁺-K⁺-ATPase in McArdle disease. *Neurology* **1998**; 50:37-40.
50. **Argov Z, Bank WJ.** Phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P-MRS) in neuromuscular disorders. *Ann Neurol* **1991**; 30:90-97
51. **Chui LA, Munsat TL.** Dominant inheritance of McArdle-syndrome. *Arch Neurol* **1976**; 33:636-641.
52. **Schmidt B, Servidei S, Gabba AA et al.** McArdle disease in two generations: Autosomal recessive transmission with manifesting heterozygote. *Neurology* **1987**; 37:1558-1561.
53. **Tsujino S, Shanske S, DiMauro S.** Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle disease). *N Engl J Med* **1993**; 329:241- 245.
54. **Lebo RV, Gorin F, Fletterick RJ et al.** High resolution chromosome sorting and DNA spot-blot analysis assign McArdle's syndrome to chromosome 11. *Science* **1984**; 225:57-59.
55. **Lebo RV, Anderson LA, DiMauro S, Linch E, Hwang P, Fletterick RJ.** Rare McArdle disease locus polymorphic site on 11q13 contains CpG sequence. *Hum Genet* **1990**; 86:17-24.
56. **Newgard CB, Nakano K, Hwang PK, Fletterick RJ.** Sequence analysis of cDNA encoding human liver glycogen phosphorylase reveals tissue-specific codon usage. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986**; 83:8132-8136.
57. **Newgard CB, Littman DR, van Genderen C, Fletterick RJ.** Human brain glycogen phosphorylase: Cloning, sequence analysis, chromosomal mapping, tissue expression, and comparison with liver and muscle isozymes. *J Clin Invest* **1987**; 79:275.
58. **Burke J, Hwang P, Anderson L, Lebo R, Gorin F, Fletterick R.** Intron/exon structure of human gene for muscle isozyme of glycogen phosphorylase. *Proteins* **1987**; 2:177-187.

59. **Gautron S, Daeglen D, Mennecier F, Dubocq D, Kahn A, Dreyfus JC.** Molecular mechanisms of McArdle's disease (muscle glycogen phosphorylase deficiency). *J Clin Invest* **1987**; 79:275-281
60. **Servidei S, Shanske S, Zeviani M, Lebo R, Fletterick R, DiMauro S.** McArdle's disease: Biochemical and molecular genetics studies. *Ann Neurol* **1988**; 24:774-781.
61. **McConchie SM, Coackley J, Edwards RHT, Beynon RJ.** Molecular heterogeneity in McArdle's disease. *Biochim Biophys Acta* **1990**; 1096:26-32
62. **Tsujino S, Rubin LA, Shanske S, DiMauro S.** An A-to-C substitution involving the translation initiation codon in myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Hum Mutat* **1994**; 4:73-75.
63. **Vorgerd M, Kubisch C, Burwinkel B et al.** Mutation analysis in myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Ann Neurol* **1998**; 43:326-331.
64. **Bartram C, Edwards RHT, Clague J, Beynon RJ.** McArdle's diseases: a rare frameshift mutation in exon 1 of muscle phosphorylase gene. *Biochim Biophys Acta* **1994**; 1226:341-343.
65. **Bartram C, Edwards RH, Clague J, Beynon RJ.** McArdle's disease: a nonsense mutation in exon 1 of muscle glycogen phosphorylase gene explains some but not all cases. *Hum Mol Genet* **1993**; 2:1291-1293.
66. **Gamez J, Fernandez R, Bruno C, et al.** A new mutation in the regulatory domain of myophosphorylase gene affecting protein dimer contact. *Muscle Nerve* **1999**; 22:1136-1138.
67. **Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, et al.** Three new mutations in patients with myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Am J Hum Genet* **1994**; 54:44-52.
68. **Bruno C, Tamburino L, Kawashima N, et al.** A nonsense mutation in the myophosphorylase gene in a Japanese family with McArdle's disease. *Neuromusc Disord* **1999**; 9:34-37.
69. **Tsujino S, Shanske S, Martinuzzi A, et al.** Two novel missense mutations (E654K, L396P) in Caucasian patients with myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Hum Mutat* **1995**; 6:276-277.
70. **Tsujino S, Shanske S, Goto et al.** Two mutations, one novel and one frequently observed, in Japanese patients with McArdle's disease. *Hum Mol Genet* **1994**; 3:1005-1006.
71. **Bruno C, Löfberg M, Tamburino L, et al.** Molecular characterization of McArdle's disease in two large Finnish families. *J Neuro Sci* **1999**; 165:121-125.

72. **Andreu A, Bruno C, Tamburino L, et al.** A new mutation in the myophosphorylase gene (Asn684Tyr) in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscular Disor* **1999**; 9:171-173.
73. **Kubisch C, Wicklein EM, Jentsch TJ.** Molecular diagnosis of McArdle disease: Revised genomic structure of myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. *Hum Mutat* **1998**; 12:27-32.
74. **El-Schahawi M, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S.** Diagnosis of McArdle's disease by molecular genetic analysis of blood. *Neurology* **1996**; 47:579-580.
75. **Martinuzzi A, Tsujino S, Vergani L, et al.** Molecular characterization of myophosphorylase deficiency in a group of patients from Northern Italy. *J Neurol Sci* **1996**; 137:14-19.
76. **Andreu A, Bruno C, Gamez J, et al.** Molecular genetic analysis of McArdle's disease in Spanish patients. *Neurology* **1998**; 51:260-262.
77. **Vora S.** Isozymes of phosphofructokinase. *Curr Topics Biol Med Res* **1982**; 6:119-167.
78. **Davidson M, Collins M, Bryne J, et al.** Alterations in phosphofructokinase isoenzymes during early human development. *Biochem J* **1983**; 214:703-710.
79. **Davidson M, Miranda AF, Bender A et al.** Muscle phosphofructokinase deficiency: biochemical and immunological studies of phosphofructokinase in muscle culture. *J Clin Invest* **1983**; 72:545-550.
80. **Llobera M, Zorzano A.** Glucolisis. En: Herrera E (Ed): *Bioquímica 2ª Ed.* Madrid, Interamericana-McGraw Hill. **1991**, pgs. 445-472.
81. **Tarui S, Okuno G, Ikura Y, Tanaka T, Suda M, Nishikawa M.** Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **1965**; 19:517-523.
82. **Layzer RB, Rowland LP, Ranney HM.** Muscle phosphofructokinase deficiency. *Arch Neurol* **1964**; 17:512.
83. **Rowland LP, Di Mauro S, Layzer RB.** Phosphofructokinase deficiency. En: Engel AG, Banker BQ (Eds): *Myology.* New York, McGraw-Hill. **1986**, pgs. 1603-1617.
84. **Vora S, Corash L, Engel WK, et al.** The molecular mechanism of inherited phosphofructokinase deficiency associated with hemolysis and myopathy. *Blood* **1980**; 55:629-635.
85. **Mineo I, Kono N, Shimizu T, et al.** Myogenic hiperuricemia: a common pathophysiological feature of glycogenosis types III, V, and VII. *N Engl J Med* **1987**; 317:75-80.

86. **Bonilla E, Schotland DL.** Histochemical diagnosis of muscle phosphofructokinase deficiency. *Arch Neurol* **1970**; 22:8
87. **Haller RG, Lewis SF.** Glucose-induced exertional fatigue in muscle phosphofructokinase deficiency. *N Engl J Med* **1991**; 324:364-369.
88. **Haller RG, Bertocci LA.** Exercise evaluation of metabolic myopathies. En: Engel AG, Franzini-Amstrong C (Eds): *Myology 2ª Ed.* New York, McGraw-Hill. **1995**, pgs. 807-817
89. **Lewis SF, Vora S, Haller RG.** Abnormal oxidative metabolism and O₂ transport in muscle phosphofructokinase deficiency. *J Appl Physiol* **1991**; 70:391-398.
90. **Vorgerd M, Karitzky J, Ristow M, et al.** Muscle phosphofructokinase deficiency in two generations. *J Neurol Sci* **1996**; 141:95-99.
91. **Vora S, Durham S, Martiville B, George D, Francke U.** Assignment of the human gene for muscle-type phosphofructokinase (PFKM) to chromosome 1 (region cen - q32) using somatic cell hybrids and monoclonal anti-M antibody. *Somat Cell Genet* **1982**; 8:95-104.
92. **Van Keuren M, Drabkin H, Hart I, Harker D, Patterson D, Vora S.** Regional assignment of human liver-type 6-phosphofructokinase to chromosome 21q22.3 by using somatic cell hybrids and monoclonal anti-L-antibody. *Hum Genet* **1996**; 74:34-40.
93. **Morrison N, Simpson C, Fothergill-Gilmore L, Boyd E, Connor JM.** Regional chromosomal assignment of the human platelet phosphofructokinase gene to 10p15. *Hum Genet* **1992**; 89:105-106.
94. **Howard RD, Akots G, Bowden DW.** Physical and genetic mapping of the muscle phosphofructokinase gene (PFKM): reassignment to human chromosome 12q. *Genomics* **1996**; 34:122-127.
95. **Nakajima H, Noguchi T, Yamasaki T, et al.** Cloning of human muscle phosphofructokinase cDNA. *FEBS Lett* **1987**; 113-116.
96. **Yamasaki T, Nakajima H, Komo N, et al.** Structure of entire human muscle phosphofructokinase-encoding gene: a two promoter system. *Gene* **1991**; 104:277-282.
97. **Nakajima H, Hmaguchi T, Yamasaki T, Tarui S.** Phosphofructokinase deficiency: Recent advances in molecular biology. *Muscle & Nerve* **1995**; S3:28-34.
98. **Raben N, Sherman JB, Adams E, Nakajima H, Argov Z, Plotz P.** Various classes of mutations patients with phosphofructokinase deficiency (Tarui's disease). *Muscle Nerve* **1995**; S3:35-38.

99. **Raben N, Sherman JB, Miller F, Mena H, Plotz P.** A 5-prime splice junction mutation leading to exon deletion in an Ashkenazi Jewish family with phosphofructokinase deficiency (Tarui disease). *J Biol Chem* **1993**; 268:4963-4967.
100. **Tsujino S, Sevidei S, Tonin P, Shanske S, Azan G, DiMauro S.** Identification of three novel mutations in non-Ashkenazi Italian patients with phosphofructokinase deficiency. *Am J Hum Genet* **1994**; 54:812-819.
101. **Nichols RC, Rudolphi O, EK B, Exelbert R, Plozt PH, Raben N.** Glycogenosis type VII (Tarui disease) in a Swedish family: two novel mutations in muscle phosphofructokinase gene (PFK-M) resulting in intron retentions. *Am J Hum Genet* **1996**; 59:59-65.
102. **Nakajima H, Kono N, Yamasaki t, et al.** Genetic defect in muscle phosphofructokinase deficiency. Abnormal splicing of the muscle phosphofructokinase gene due a point mutation at the 5'-splice site. *J Biol Chem* **1990**; 265:9392-9395.
103. **Hamaguchi T, Nkajima H, Noguchi T, et al.** A new variant of muscle phosphofructokinase deficiency in a Japanese case with abnormal RNA splicing. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**; 202:444-449.
104. **Sherman JB, Raben N, Nicastrì C, et al.** Common mutations in the phosphofructokinase-M gene in Ashkenazi Jewish patients with glycogenosis VII and their population frequency. *Am J Hum Genet* **1994**; 55:305-313.
105. **Vasconcelos O, Sivakumar K, Dalakas M, et al.** Nonsense mutation in the phosphofructokinase muscle subunit gene associated with retention of intron 10 in one of the isolated transcripts in Ashkenazi Jewish patients with Tarui disease. *Proc Nat Acad Sci USA* **1995**; 92:10322-10326.
106. **Raben N, Exelbert R, Spiegel R, et al.** Functional expression of human mutant phosphofructokinase in yeast: genetic defects in French Canadian and Swiss patients with phosphofructokinase deficiency. *Am J Hum Genet* **1995**; 56:131-141.
107. **Hamaguchi T, Nakajima H, Noguchi T, et al.** Novel missense mutation (W686C) of phosphofructokinase-M gene in a Japanese patient with a mild form of glycogenosis VII. *Hum Mutat* **1996**; 8:273-275.
108. **Bruno C, Minetti C, Shanske S, et al.** Combined defects of muscle phosphofructokinase and AMP deaminase in child with myoglobinuria. *Neurology* **1998**; 50:296-298.
109. **Ogasawara N, Goto H, Yamada Y, Watanabe T, Asano T.** AMP deaminase isozymes in human tissues. *Biochim Biophys Acta* **1982**; 714:298-306.

110. **Jacobs AE, Oosterhof A, Benders AA, Veerkamp H.** Expression of different isoenzymes of adenylate deaminase in cultured human muscle cells. Relation to myoadenylate deaminase deficiency. *Biochim Biophys Acta* **1992**; 1139:91-95.
111. **Gross M.** Clinical heterogeneity and molecular mechanisms in inborn muscle AMP deaminase deficiency. *J Inher Metab Dis* **1997**; 20:186-192.
112. **Benito M, Culebras JM.** Bioquímica del tejido muscular esquelético y cardiaco. En: Herrera E (Ed). *Bioquímica*, Madrid: Interamericana. **1986**, pgs 1163-1174
113. **Van den Berghe, Hers HG.** Abnormal AMP deaminase in primary gout. *Lancet* **1980**; II:1090.Letter.
114. **Lowestein JM.** Ammonia production in muscle and other tissues: The purine nucleotide cycle. *Physiol Rev* **1972**; 52:382-413.
115. **Atkinson DE.** The energy charge of adenylate pool as regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* **1968**; 7:4030-4034.
116. **Sabina RL, Swain JI, Holmes EW.** Myoadenylate deaminase deficiency. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6^a Ed. McGraw-Hill, New York. **1989**; pgs. 1077-1184.
117. **Mercelis R, Martin JJ, de Barsey T, Van der Berghe G.** Myoadenylate deaminase deficiency: absence of correlation with exercise intolerance in 452 biopsies. *J Neurol* **1987**; 234:385-389
118. **Shumate JB.** Myoadenylate deaminase deficiency - a nonfamilial, nondisease? *Neurology* **1983**; 33:1533-1534
119. **Joosten E, van Bennekom C, Oerlemans F, De Bruyn C, Oei T, Trijbels J.** Myoadenylate deaminase deficiency: an enzyme defect in search of a disease. *Adv Exp Med Biol* **1984**; 165A:85-89.
120. **Sinkeler SP, Joosten EM, Wevers RA et al.** Myoadenylate deaminase deficiency: a clinical, genetic, and biochemical study in nine families. *Muscle Nerve* **1988**; 11:312-317.
121. **Norman B, Glenmark B, Jansson E.** Muscle AMP deaminase deficiency in 2% of healthy population. *Muscle & Nerve* **1995**; 18:239-241.
122. **Norman B, Mahnke-Zizelman DK, Vallis A, Sabina RL.** Genetic and other determinants of AMP deaminase activity in healthy adult skeletal muscle. *J App Physiol* **1998**; 85:1273-1278.
123. **Heller SL, Kaiser KK, Planer GJ, Hagber JM, Brooke MH.** McArdle's disease with myoadenylate deaminase deficiency: observations in a combined enzyme deficiency. *Neurology* **1987**; 37:1039-1042.

124. **Reuschenbach C, Zierz S.** Mutant carnitine palmitoyltransferase deficiency associated with myoadenylate deaminase deficiency in skeletal muscle *J Pediatr* **1988**; 112:600-603.
125. **Fishbein WN.** Myoadenylate deaminase deficiency: Inherited and acquired forms. *Biochem Med* **1985**; 33:158-169.
126. **Sabina RL.** Myoadenylate deaminase deficiency: A common inherited defect with heterogeneous clinical presentation. *Neurologic Clinics of North America* **2000**;18:185-194.
127. **Fishbein WN, , Griffin JL, Armbrustmacher VW.** Stain for skeletal muscle adenylate deaminase: An effective tetrazolium stain for frozen biopsy specimens. *Arch Pathol Lab Med* **1980**; 104:462-466.
128. **Norman B, Hellsten-Westing Y, Sjodin B, Jansson E.** AMP deaminase in skeletal muscle of healthy males quantitatively determined by new assay. *Acta Physiol Scand* **1994**; 150:397-403.
129. **Sinkeler SP, Webers RA. Joosten EM et al.** Improvement of screening in exertional myalgia with standardized ischemic forearm test. *Muscle Nerve* **1986**; 9:731-737.
130. **Sabina RL, Swain JL, Patten BM, Ashizawa T, O'Brien WE, Holmes EW.** Disruption of purine nucleotide cycle. A potential explanation for muscle dysfunction in myoadenylate deaminase deficiency. *J Clin Invest* **1980**; 66:1419-1423.
131. **Sabina RL, Swain JI, Holmes EW.** Functional and biochemical evidence of the importance of the purine nucleotide cycle in muscle. *J Clin Chem Clin Biochem* **1982**; 20:414.
132. **Sabina RL, Swain JI, Olano CW, et al.** Myoadenylate deaminase deficiency. Functional and metabolic abnormalities associated with disruption of the purine nucleotide cycle. *J Clin Invest* **1984**; 73:720-730.
133. **Layzer RB.** Muscle pain, cramps and fatigue. En: Engel AG, Franzini-Amstrong C (Eds): *Myology 2^a Ed.* New York, McGraw-Hill. **1995**, pgs. 1754-1768.
134. **Sabina RL, Morisaki T, Clarke P, et al.** Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. *J Biol Chem* **1990**; 265:9423-9433.
135. **Morisaki T, Sabina RL, Holmes EW.** Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats. *J Biol Chem* **1990**; 265:11482-11486.
136. **Mahnke-Zizelman DK, van der Bergh F, Bausch-Jurken MT, et al.** Cloning, sequence and characterization of the human AMPD2 gene: evidence for transcriptional regulation by two closely spaced promoters. *Biochim Biophys Acta* **1996**; 1308:122-132.

137. **Mahnke-Zizelman DK, Sabina RL.** Cloning of human AMP deaminase isoform E cDNAs. Evidence for a third AMPD gene exhibiting alternatively spliced 5'-exons. *J Biol Chem* **1992**; 267:20866-20877.
138. **Yamada Y, Goto H, Ogasawara N.** Cloning and nucleotide sequence of the cDNA encoding erythrocyte-specific AMP deaminase. *Biochim Biophys Acta* **1992**; 1171:125-128.
139. **Morisaki H, Morisaki T, Newby LK, Holmes EW.** Alternative splicing: a mechanism for phenotypic rescue of a common inherited defect. *J Clin Invest* **1993**; 91:2275-2280.
140. **Sabina RL, Fishbein WN, Peseshpour G, Clarke PR, Holmes EW.** Molecular analysis of myoadenylate deaminase deficiency. *Neurology* **1992**; 42:170-179.
141. **Morisaki T, Gross M, Morisaki H, Pongratz D, Zöllner N, Holmes EW.** Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle. *Proc Nat Acad Sci USA* **1992**; 89:6457-6461.
142. **Verzijl HT, van Engelen BG, Luyten JA, et al.** Genetic characteristics of myoadenylate deaminase deficiency. *Ann Neurol* **1998**; 44:140-143.
143. **Fishbein WN.** Primary, secondary, and coincidental types of myoadenylate deaminase deficiency. *Ann Neurol* **1999**; 45:547.
144. **Verzijl HFTM, van Engelen BGM, Luyten JAFM, et al.** Primary, secondary, and coincidental types of myoadenylate deaminase deficiency: A reply. *Ann Neurol* **1999**; 45:547-548.
145. **Murthy MS, Pande SV.** Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **1987**; 84:378-382
146. **Murthy MS, Pande SV.** Characterization of a solubilized malonyl-CoA-sensitive carnitine palmitoyltransferase from the mitochondrial outer membrane as a protein distinct from the malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase of the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* **1990**; 268:599-604.
147. **Kerner J, Hoppel C.** Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu Rev Nutr* **1998**; 18:179-206
148. **Pande SV.** A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system. *Proc Natl Acad Sci USA* **1975**; 72:883-887.
149. **Brieber LL.** Carnitine. *Annu Rev Biochem* **1988**; 57:261-283.
150. **Fritz IB.** Carnitine and its role in fatty acid metabolism. *Adv Lipid Res* 1963; 1:285-334

151. **Bremer J.** Carnitine in intermediary metabolism. The metabolism of fatty acid esters of carnitine by mitochondria. *J Biol Chem* **1962**; 237:3628-3632.
152. **Ramsay RR, Tubbs PK.** The mechanism of fatty acid uptake by heart mitochondria: an acylcarnitine-carnitine exchange. *FEBS Lett* **1975**; 54:21-25.
153. **Bremer J.** Carnitine-metabolism and functions. *Physiol Rev* **1983**; 63:1420-1425.
154. **Lund H.** Carnitine palmitoyl transferase: characterization of a labile detergent extracted malonyl-CoA sensitive enzyme from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1987**; 918:67-73.
155. **Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW, McGarry JD.** Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. II. Use of detergents and antibodies. *J Biol Chem* **1987**; 262:9822-7.
156. **McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW.** Carnitine palmitoyl-transferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J Biol Chem* **1978**; 253:4128-4136
157. **McGarry JD, Brown NF.** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* **1997**; 244:1-14.
158. **McGarry JD, Foster DW.** Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Ann Rev Biochem* **1980**; 49:395-420.
159. **Bremer J.** The role of carnitine in cell metabolism. En: De Simone C, Famularo G (Eds): *Carnitine Today*. Landes Bioscience. **1997**; pgs. 1-37.
160. **Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD.** High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* **1995**; 270:17513-17520.
161. **Murthy MS, Pande SV.** Molecular biology of carnitine palmitoyltransferases and role of carnitine in gene transcription. En: De Simone C, Famularo G (eds): *Carnitine Today*. Landes Bioscience. **1997**; pgs 39-70.
162. **Weiss Bc, Esser V, Foster DW, McGarry JD.** Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem* **1994**; 269:18712-18715.
163. **Britton CH, Schultz RA, Zhang B, Esser V, Foster DW, McGarry JD.** Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**; 92:1984-1988.

164. **Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Yamanaka Y, Terada H.** Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase. *FEBS Lett* **1995**; 363:41-45.
165. **Britton CH, Mackey DW, Esser V, et al.** Fine chromosome mapping of the genes for human liver and muscle carnitine palmitoyltransferase I (CPT1A and CPT1B). *Genomics* **1997**; 40:209-211.
166. **Van der Leif FR, Takens J, Van der Veen AY, Terpstra P, Huipers JR.** Localization and intron usage analysis of the human CPT1B gene for muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *Biochim Biophys Acta* **1997**; 1352:123-128.
167. **McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW.** Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of presence of malonyl-CoA in non hepatic tissues of the rat. *Biochem J* **1983**; 214:229-232
168. **Weiss BC, Cowan AT, Brown N, Foster DW, McGarry JD.** Use a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart: evidence taht the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme. *J Biol Chem* **1994**; 269:26443-26448.
169. **Weis BC, Esser V, Foster DW, McGarry JD.** Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: the minor component is identical to the liver enzyme. *J Biol Chem* **1994**; 269:18712-18715.
170. **Brown NF, Weis BC, Husti JE, Foster DW, McGarry JD.** Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J Biol Chem* **1995**; 270:8952-8957.
171. **Finocchiaro G, Taroni F, Rocchi M et al.** cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**; 88:661-665.(corrección 10.981)
172. **Woeltje KF, Esser V, Wis BC, et al.** Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase II. *J Biol Chem* **1990**; 265:10720-10725.
173. **Brown NF, Esser V, González AD, et al.** Mitochondrial import and processing of rat liver carnitine palmitoyltransferase II defines the amino terminus of mature protein: possibility of diferential modification of the rat an human isoforms. *J Biol Chem* **1991**; 266:15446-15449.

174. **Gellera C, Verderio E, Florida G, et al.** Assignment of the human carnitine palmitoyltransferase II gene (CPT1) to chromosome 1p32. *Genomics* **1994**; 24:195-197.
175. **Brown NF, Anderson RC, Capaln SL, Foster DW, McGarry JD.** Catalytically important domains of rat carnitine palmitoyltransferase II as determined by site-directed mutagenesis and chemical modification: evidence for a critical histidine residue. *J Biol Chem* **1994**; 29:19157-19162.
176. **Di Donato S.** Diseases associated with defects of beta-oxidation. En: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL (Eds): *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*,. 2^a Ed. Boston, Butterworth-Heinemann. **1996**, pgs. 939-956.
177. **Land JM, Mystry S, Waquier M, et al.** Neonatal carnitine palmitoyltransferase-2 deficiency: a case presenting with myopathy. *Neurmusc Disord* **1995**; 5:129-137.
178. **Hug G, Bove KE, Soukup S.** Lethal neonatal multiorgan deficiency of carnitine palmitoyltransferase II. *N Engl J Med* **1991**; 325:1862-1864.
179. **Demaugre F, Bonnefont JP, Colonna M, Capanec C, Leroux JP, Saudubray JN.** Infantile form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatomuscular symptoms and sudden death: physiopathological approach to carnitine palmitoyltransferases II deficiencies. *J Clin Invest* **1991**; 87:859-864.
180. **Tein I, Christodoulou J, Donner E, McInnes RR.** Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: A new cause of recurrent pancreatitis. *J Pediatr* **1994**; 124:938-940.
181. **North KN, Hoppel CL, De Girolami U, Kozakewich HP, Korson MS.** Lethal neonatal deficiency of carnitine palmitoyltransferase II associated with dysgenesis of brain and kidneys. *J Pediatr* **1995**; 127:414-420
182. **Thuiller L, Sevin C, Demaugre F, et al.** Genotype/phenotype correlation in carnitine palmitoyltransferase II deficiency: lessons from a compound heterozygous patient. *Neurmusc Disord* **2000**; 10:200-205.
183. **Di Donato S, Castiglione A, Rimoldi M, et al.** Heterogeneity of carnitine palmitoyltransferase deficiency. *J Neurol Sci* **1981**; 50:207-215.
184. **Kramer JH, Wegliki WB.** Inhibition of sarcolemmal Na-K-ATPase by palmitoylcarnitine. Potentiation by propranolol. *Am J Physiol* **1985**; 248:H75.
185. **LeCluyse EL, Apel LE, Sutton SC.** Relationship between drug absorption enhancing activity and membrane perturbing effects of acetylcarnitine. *Pharm Res* **1991**; 8:84-87
186. **Robin AP, Askanazy J, Cooperman A, et al.** Influence of hypercaloric glucose infusions on fuel economy in surgical patients: A review. *Crit Care Med* **1981**; 9:680-686.

187. **Mongini T, Doriguzzi C, Palmucci L, et al.** Myoglobinuria and carnitine palmitoyltransferase deficiency in a father and a son. *J Neurol* **1991**; 238:323
188. **Verderio E, Cavadini P, Montermini L et al.** Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: structure of the gene and characterization of two novel disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* **1995**; 4:19-29.
189. **Yang BZ, Ding JH, Dewese T, et al.** Identification of four novel mutations in patients with carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency. *Mol Genet Metab* **1998**; 64:229-236.
190. **Gellera C, Witt DR, Verderio E, et al.** Molecular study of lethal neonatal carnitine palmitoyltransferase (CPT II) deficiency. *Am J Hum Genet* **1992**; 51:A68.
191. **Taroni F, Verderio E, Dworzak F, Willems PJ, Cavadini P, DiDonato S.** Identification of a common mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in familial recurrent myoglobinuria patients. *Nat Genet* **1993**; 4:314-320.
192. **Yang BZ, Ding JH, Roe D, Dewese T, Day DW, Roe CR.** A novel mutation identified in carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Mol Genet Metab* **1998**; 63:110-115.
193. **Yamamoto S, Abe H, Kohgo T, et al.** Two novel gene mutations (Glu174Lys, Phe383Tyr) causing the "hepatic" form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Genet* **1996**; 98:116-118.
194. **Wieser T, Deschauer M, Zierz S.** Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: three novel mutations. *Ann Neurol* **1997**; 42:414-415.
195. **Taroni F, Gellera C, Cavadini P, et al.** Lethal carnitine palmitoyltransferase (CPT) II deficiency in newborns: A molecular genetic study. *Am J Hum Genet* **1994**; 55:A245.
196. **Taggart RT, Samil D, Apolito C, Valduti GD.** Novel mutations associated with carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Mutat* **1999**; 13:210-220.
197. **Bruno C, Bado M, Minetti C, Cordone G, DiMauro S.** Novel mutation in the CPT II gene in a child with periodic febrile myalgia and myoglobinuria. *J Child Neurol* **2000**; 15:390-393.
198. **Boneffont JP, Taroni F, Cavadini P, et al.** Molecular analysis of carnitine palmitoyltransferase II deficiency with hepatocardiomyocardial expression. *Am J Hum Genet* **1996**; 58:971-978.
199. **Taroni F, Verdiero E, Fiorucci S, et al.** Molecular characterization of inherited carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**; 89:8429-8443.

200. **Zierz S, Engel AG, Olek K.** The Ser113Leu mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene in patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Muscle & Nerve* **1994**; Suppl 1:S129.
201. **Kaufmann P, El-Schahawi M, DiMauro S.** Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: Diagnosis by molecular analysis of blood. *Mol Cell Biochem* **1997**; 174:237-239.
202. **Handig I, Dams E, Taroni F, Van Laere S, De Barse T, Willemens PJ.** Inheritance of the S113L mutation within an inbred family with carnitine palmitoyltransferase enzyme deficiency. *Hum Genet* **1996**; 97:291-293.
203. **Merinero B, Castro M, Gangoiti M, et al.** Carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency with infantile presentation: biochemical and genetic analysis. *J Inher Metab Dis* **1998**; 21(Suppl. 2):A122.
204. **Salen RS, Peters T.** Analytical goals and clinical relevance of laboratory procedures. En: Tietz NW (Ed): *Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia, Saunders WB. **1986**, pgs. 387-409.
205. **Peters T, Westgard JO.** Evaluation of methods. En: Tietz NW (Ed): *Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia, Saunders WB. **1986**, pgs. 410-423.
206. **Queraltó JM.** *Teoría de valores de referencia. Documentos de la Comisión de Valores de Referencia de la Sociedad Española de Química Clínica*. Barcelona, Masanas Gráficas. **1993**.
207. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual 2ª Ed.* Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1989**.
208. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **1988**; 16:1215.
209. **DiMauro S, Hartwig GB, Hays AP, et al.** Debrancher deficiency: neuromuscular disorder in five adults. *Ann Neurol* **1979**; 5:422-436.
210. **Hays AP, Hallet M, Delfs J et al.** Muscle phosphofructokinase deficiency: Abnormal polysaccharide in a case of late-onset myopathy. *Neurology* **1981**; 31:1077-1086.
211. **Norum K.** PalmitoylCoA:carnitine palmitoyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1964**;89:95-108.
212. **Zierz S, Engel AG.** Regulatory properties of a mutant carnitine palmitoyltransferase in human skeletal muscle. *Eur J Biochem* **1985**; 149:207-214.
213. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall NJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**; 193:265-275

214. **Sanger F.** Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **1981**; 214:1205-1210.
215. **Smith LM, Snaders JZ, Kaiser RJ, et al.** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **1986**; 321:674-679.
216. **Carrasco JL.** El método estadístico en la investigación médica. 5ª ed. Editorial Ciencia 3. Madrid **1992**.
217. **Rubio J, Martín MA, García A, et al.** McArdle's disease associated with homozygosity for the missense mutation Gly204Ser of the myophosphorylase gene in a Spanish patient. *Neuromusc Disord* **1999**; 9:174-175.
218. **Martín MA, Rubio JC, Campos Y, Vílchez J, Cabello A, Arenas J.** Two homozygous mutations (R193W and 794/795 delAA) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle's disease. *Hum Mutat* **2000**; 321:674-679 (Mutation In Brief On Line #296).
219. **Rubio JC, Martín MA, Campos Y, Auciello R, Cabello A, Arenas J.** A missense mutation W797R in the myophosphorylase gene in Spanish patient with McArdle's disease. *Muscle Nerve* **2000**; 23:129-131.
220. **Fernández R, Navarro C, Andreu AL, et al.** A novel missense mutation (W797R) in the myophosphorylase gene in Spanish patients with McArdle's disease. *Arch Neurol* **2000**; 57:217-219.
221. **Martín MA, Rubio JC, García A, et al.** Resolution of a mispaired secondary structure intermediate could account for a novel micro-insertion/deletion (387 ins A/del 8 bp) in the *PYGM* gene causing McArdle's disease. *Clin Genet* **2001**; 59:48-51.
222. **Cooper DN, Krawzack M.** Mechanisms of insertional mutagenesis in human genes causing genetic disease. *Hum Genet* **1991**; 87:409-415.
223. **Krawzack M, Cooper DN.** Gene deletions causing genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence environment. *Hum Genet* **1991**; 86:425-441.
224. **Browner MF, Fletterick RJ.** Phosphorylase: a biological transducer. *Trends Biochem* **1992**; 17:66-710.
225. **Tan P, Allen JG, Wilton SD, Akkari PA, Huxtable CR, Laing NG.** A splice-site mutation causing ovine McArdle's disease. *Neuromusc Disord* **1997**; 7:336-342.
226. **Rubio JC, Martín MA, Campos Y, Cabello A, Arenas J.** A missense mutation T487N in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromusc Disord* **2000**; 10:138-140.

227. **Tsujino S, Shanske S, Valberg SJ, Cardinet GH, Smith BS, DiMauro S.** Cloning of bovine muscle glycogen phosphorylase cDNA and identification of a mutation in cattle with myophosphorylase deficiency, an animal model for McArdle's disease. *Neuromusc Disord* **1995**; 6:19-26.
228. **Martín MA, Rubio JC, Campos Y, Ricoy JR, Cabello A, Arenas J.** A homozygous missense mutation (A659D) in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromusc Disord* **2000**; 10:447-449.
229. **Rubio JC, Martín MA, del Hoyo P, et al.** Molecular analysis of Spanish patients with AMP deaminase deficiency. *Muscle Nerve* **2000**; 23:1175-1178.
230. **Campos Y, Rubio JC, Martín MA, Bautista J, Arenas J.** A3243G point mutation in the mitochondrial DNA in a patient homozygous for the most common nonsense mutation of AMP deaminase gene. *J Neurol Sci* **1997**; 150(suppl):S40.
231. **Schon EA, Bonilla E, DiMauro S.** Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr* **1997**; 29:131-149.
232. **Rubio JC, Martín MA, Bautista J, Campos Y, Segura D, Arenas J.** Association of genetically proven deficiencies of myophosphorylase and AMP deaminase: a second case of "double trouble". *Neuromusc Disord* **1997**; 7:387-389.
233. **Tsujino S, Shanske S, Carroll JE, Sabina RL, DiMauro S.** Double-trouble: Combined myophosphorylase and AMP deficiency in a child homozygous for non-sense mutations at both loci. *Neuromusc Disord* **1995**; 5:263-266.
234. **Martín MA, Rubio JC, Bustos F, et al.** Molecular analysis in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Muscle Nerve* **1999**; 22:941-943.
235. **Martín MA, Rubio JC, del Hoyo P, et al.** Identification of novel mutations in Spanish patients with muscle carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Hum Mutat* **2000**; 15:579-578 (Mutation In Brief On Line #332).

APÉNDICE

CÓDIGOS ESTÁNDAR DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS NUCLEÍCOS DE LA UNIÓN INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA (IUB) Y LA UNIÓN INTERNACIONAL DE QUÍMICA PURA Y APLICADA (IUPAC)

ÁCIDOS NUCLEÍCOS

Símbolo	Tipo de nucleótido	Símbolo	Tipo de nucleótido
A	adenina	M	A C (amino)
C	citosina	S	G C (fuerte)
G	guanina	W	A T (débil)
T	timidina	B	G T C
U	uridina	D	G A T
R	G A (purina)	H	A C T
Y	T C (pirimidina)	V	G C A
K	G T (ceto)	N	A G C T (cualquiera)

AMINOÁCIDOS

Símbolo	Tipo de aminoácido	Símbolo	Tipo de aminoácido
A	alanina	N	asparragina
B	aspartato o asparragina	P	prolina
C	cisteina	Q	glutamina
D	aspartato	R	arginina
E	glutamato	S	serina
F	fenilalanina	T	treonina
G	glicina	U	selenocisteina
H	histidina	V	valina
I	isoleucina	W	triptófano
K	lisina	Y	tirosina
L	leucina	Z	glutamato o glutamina
M	metionina	X	parada de traducción