

DEPARTAMENT DE MEDICINA

ESTUDIO DE LAS MIOPATÍAS DISTALES, EN
PARTICULAR DE UNA FORMA ENDÉMICA DE LA
REGIÓN DE LA SAFOR.

NURIA MUELAS GÓMEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 2 de novembre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Juan Ascasio Gimilio
- Dra. Isabel Illa Sendra
- Dr. Antoni Llurs Andreu Periz
- Dra. Ana Ferreiro Sieiro
- Dr. Josep Redon Mas

Va ser dirigida per:

Dr. Juan Jesús Vílchez Padilla

©Copyright: Servei de Publicacions
Nuria Muelas Gómez

Dipòsit legal: V-3368-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7992-9

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

FACULTAT DE MEDICINA

Departament de Medicina

**ESTUDIO DE LAS MIOPATÍAS DISTALES,
EN PARTICULAR DE UNA FORMA
ENDÉMICA DE LA REGIÓN DE *LA SAFOR***

TESIS DOCTORAL

Presentada por

Nuria Muelas Gómez

para optar al grado de *Doctora en Medicina*

Valencia, Mayo 2010

D. Juan Jesús Vílchez Padilla, Doctor en Medicina por la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que **Dña. Nuria Muelas Gómez**, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Estudio de las miopatías distales, en particular de una forma endémica de la región de *La Safor*”**, para la obtención del grado de Doctora en Medicina.

En Valencia, a quince de mayo de dos mil diez.

D. Juan Jesús Vílchez Padilla.

La presente Tesis Doctoral forma parte del proyecto de investigación dentro del **Programa de Formación en Investigación para Profesionales con formación Sanitaria Especializada**, financiado por el *Instituto de Salud Carlos III* y *La Fundación de Investigación* del Hospital La Fe de Valencia (Orden CM06/00154 del Ministerio de Sanidad y Consumo).

A Ramón, Valentina, Eva, José y Nacho

*Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Has de pregar que el camí sigui llarg,
que siguin moltes les matinades
que entraràs en un port que els teus ulls ignoraven,
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben.
Tingues sempre al cor la idea d'Ítaca.
Has d'arribar-hi, és el teu destí,
però no forçis gens la travessia [...].*

*Més lluny, heu d'anar més lluny
dels arbres caiguts que ara us empresonen,
i quan els haureu guanyat
tingueu ben present no aturar-vos.
Més lluny, sempre aneu més lluny,
més lluny de l'avui que ara us encadena.
I quan sereu deslliurats
torneu a començar els nous passos.
Més lluny, sempre molt més lluny,
més lluny del demà que ara ja s'acosta.
I quan creieu que arribeu, sapigueu trobar noves sendes [...].*

Ítaca, cançión de Lluís Llach sobre un poema de Kavafis

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral constituye la culminación de mi etapa de formación como médico, neurólogo e investigador. En este periplo he contado con estupendos maestros, quienes de forma desinteresada y con mucha paciencia han sabido transmitirme sus conocimientos y también su pasión por la Medicina y la Ciencia.

En primer lugar agradecer a mi director de tesis, Juan J. Vílchez por brindarme la oportunidad de profundizar en el estudio de estas enfermedades y por sus sugerencias, consejos y enseñanzas.

Resaltar la labor docente de Teresa Sevilla y María José Chumillas quienes de forma altruista han dedicado considerables esfuerzos para contribuir a mi formación, y despertar mi interés en la patología neuromuscular.

Agradecer a Fernando Mayordomo sus enseñanzas en patología y a Inmaculada Azorín su contribución en las técnicas de laboratorio, sus enseñanzas y su amistad. Especial agradecimiento a mi compañera y sobre todo amiga, Mercedes Garcés, sin sus consejos este trabajo no sería lo que es. También agradecer a todos los compañeros del *Centro de Investigación*, Lorena, Pilar, Manolo, Amparo y Roger.

Un agradecimiento especial a los profesores Bjarne Udd y Peter Hackman, por acogerme en el *Folkhälsan Institute of Genetics*, Helsinki, Finlandia donde además de llevar a cabo los estudios genéticos que se recogen en este trabajo he tenido la oportunidad de sumergirme en el apasionante campo de la genética molecular. Gracias por la ayuda desinteresada de los compañeros del laboratorio del *FIG*, Merja, Helena, Sara, Jakkoo y del *Tampere Research Centre*, Tiina, Sini y Jinka.

Por otro lado, el apoyo de mi familia y mis amigos ha sido fundamental para la consecución de esta etapa. Gracias a mis padres, hermana, José, Sandra, Inma, Joanna y demás amigos por su inestimable apoyo.

Por último, los verdaderos protagonistas han sido los pacientes y familiares, quienes han contribuido a la consecución de este trabajo y son el estímulo fundamental para proseguir la investigación en este campo. Muchas gracias por su colaboración.

Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| <i>ADN</i> | Acido desoxirribonucleico |
| <i>ATPasa</i> | Adenosin trifosfatasa |
| <i>cDNA</i> | ADN complementario |
| <i>CK</i> | Creatín quinasa |
| <i>COX</i> | Citocromo C oxidasa |
| <i>del</i> | Delección |
| <i>dNTP</i> | Deoxirribonucleótidos trifosfato |
| <i>ECG</i> | Electrocardiograma |
| <i>EHL</i> | <i>Extensor hallucis longus</i> |
| <i>FRR</i> | Fibra rojo-rota |
| <i>GNE</i> | <i>N-acetylglucosamine 2 epimerasa/N-acetylmannosamine kinase</i> |
| <i>HE</i> | Hematoxilina-eosina |
| <i>IBM</i> | Miopatía por cuerpos de inclusión |
| <i>LGMD</i> | Distrofia muscular de cinturas |
| <i>mRNA</i> | ARN mensajero |
| <i>MFM</i> | Miopatía miofibrillar |
| <i>MMII</i> | Miembros inferiores |
| <i>MRC</i> | <i>Medical Research Council</i> |
| <i>MyHC</i> | Cadena pesada de la miosina |
| <i>MYH7</i> | Gen de la cadena pesada de la miosina lenta o β -cardíaca |
| <i>p.</i> | Posición en la secuencia proteica de referencia |
| <i>PAS</i> | Periodic acid-Schiff |
| <i>pb</i> | Pares de bases |
| <i>PCR</i> | Reacción en cadena de la polimerasa |
| <i>PUAM</i> | potenciales de acción de unidad motora |
| <i>RM</i> | Resonancia magnética |
| <i>SDH</i> | Succinato deshidrogenasa |
| <i>SNPs</i> | Polimorfismos de nucleótido único |
| <i>STIR</i> | <i>Short T1 inversion recovery</i> |
| <i>T</i> | Tesla |
| <i>TAC</i> | Tomografía axial computerizada |
| <i>TMD</i> | Distrofia muscular tibial |
| <i>TTN</i> | Titina |
| <i>VCP</i> | <i>Valosin containing protein</i> |
| <i>ZASP</i> | <i>Z-band alternatively spliced PDZ-motif containing protein</i> |

Índice

| | |
|---|-----------|
| Resumen..... | 1 |
| A. Introducción..... | 7 |
| 1. Definición de miopatía distal..... | 9 |
| 2. Estructura del sarcómero..... | 9 |
| 3. Clasificación de las miopatías distales..... | 11 |
| a. Miopatía distal de Laing..... | 12 |
| b. Miopatía de Miyoshi..... | 13 |
| c. Miopatía distal de Udd..... | 14 |
| d. Miopatía de Nonaka..... | 15 |
| e. Miopatía de Welander..... | 15 |
| f. Miopatía de Markesbery-Griggs..... | 16 |
| g. Miopatía distal por mutaciones en la nebulina..... | 16 |
| h. Miopatías miofibrilares..... | 17 |
| i. Miopatía distal con debilidad vocal y faríngea (MPD2)..... | 17 |
| j. Fenocopias de miopatías distales..... | 18 |
| 4. Interés actual del tema..... | 18 |
| 5. Abordaje diagnóstico de las miopatías distales..... | 20 |
| a. Analítica sanguínea..... | 21 |
| b. Estudios neurofisiológicos..... | 21 |
| c. Técnicas de imagen muscular..... | 22 |
| d. Técnicas patológicas..... | 22 |
| e. Genética molecular..... | 23 |
| 6. Diagnóstico diferencial..... | 24 |
| B. Hipótesis de trabajo..... | 27 |
| C. Objetivos..... | 31 |
| D. Material y Métodos..... | 35 |
| 1. Población de estudio..... | 38 |
| 1.1. Pacientes..... | 38 |
| 1.2. Grupo de individuos sanos..... | 39 |
| 1.3. Grupo de individuos clínicamente indeterminados..... | 39 |
| 2. Variables del estudio..... | 39 |
| 2.1. Datos demográficos..... | 39 |
| a. Cronológicos..... | 39 |

| | |
|---|------------|
| b. Género..... | 40 |
| 2.2. Características clínicas..... | 40 |
| a. Estado clínico..... | 40 |
| b. Síntomas..... | 40 |
| c. Exploración neurológica, fenotipo y curso clínico..... | 41 |
| d. Valoración de la discapacidad funcional..... | 41 |
| 2.3. Laboratorio..... | 43 |
| 2.4. Evaluación de la función cardiaca..... | 43 |
| 2.5. Evaluación del aparato respiratorio..... | 44 |
| 2.6. Estudios electrofisiológicos..... | 44 |
| 2.7. Morfología muscular (TC/RM Muscular)..... | 45 |
| 2.8. Patología..... | 48 |
| a. Microscopía óptica..... | 49 |
| b. Microscopía de fluorescencia..... | 49 |
| c. Western blot..... | 50 |
| d. Microscopía electrónica..... | 51 |
| 2.9. Genética..... | 52 |
| a. Análisis mutacional..... | 52 |
| b. Estudio de haplotipos..... | 53 |
| c. Estudios de ligamiento..... | 54 |
| E. Resultados..... | 57 |
| 1. Datos demográficos..... | 59 |
| 1.1. Edad..... | 59 |
| 1.2. Género..... | 60 |
| 2. Características clínicas..... | 61 |
| 2.1. Estado clínico..... | 61 |
| 2.2. Síntomas..... | 61 |
| 2.3. Exploración neurológica, fenotipo y curso clínico..... | 62 |
| 2.4. Discapacidad funcional..... | 75 |
| 3. Datos de laboratorio..... | 76 |
| 4. Evaluación de la función cardiaca..... | 76 |
| 5. Evaluación del aparato respiratorio..... | 78 |
| 6. Estudios electrofisiológicos..... | 78 |
| 7. Imagen muscular (TAC/RM Muscular)..... | 81 |
| 8. Características patológicas..... | 87 |
| 9. Estudios genéticos..... | 98 |
| F. Discusión..... | 105 |
| G. Conclusiones..... | 127 |

Bibliografía..... 133
Anexo I..... 147
Anexo II..... 151
Anexo III..... 157
Anexo IV..... 167
Anexo V..... 173

RESUMEN

Las miopatías distales son un grupo heterogéneo de enfermedades musculares hereditarias, relativamente prevalentes en la *Comunidad Valenciana*, España. En este trabajo se han estudiado pacientes con una miopatía distal anterior de herencia autosómico dominante pertenecientes a siete familias, cuatro de las cuales proceden de la comarca de *La Safor*. Se elaboraron los pedigríes y se evaluó clínicamente a los pacientes. Con posterioridad se valoró la posible asociación de neuropatía y/o miocardiopatía y se estudió el patrón de afectación muscular mediante pruebas de imagen, los hallazgos neurofisiológicos, y los rasgos miopatológicos. Se realizó un abordaje genético de los pacientes, mediante secuenciación y haplotipos. Los pacientes de las diferentes familias estudiadas presentaron un fenotipo clínico similar, para el mismo grado de gravedad de la enfermedad, pero se constató una ostensible variabilidad interindividual, intrafamiliar e interfamiliar. Aunque la afectación de la musculatura anterior de la pierna fue el rasgo común en todos ellos, algunos pacientes manifestaron un fenotipo escápulo-peroneal o de cinturas. Mediante técnicas de imagen muscular se corroboró la frecuente implicación de musculatura proximal y axial, y se definió un patrón de afectación muscular característico. Aunque se descartó la asociación con neuropatía, en los estudios neurofisiológicos frecuentemente aparecieron rasgos neurógenos, que pueden ser secundarios a fenómenos de remodelación de la unidad motora. Sólo un paciente asoció miocardiopatía, indicando que la afectación del miocardio es posible pero infrecuente. Los hallazgos patológicos más consistentes fueron el predominio/hipotrofia de las fibras tipo 1; las alteraciones en la actividad enzimática oxidativa constituyendo cores/multi-minicores; y las anomalías mitocondriales. Todos los pacientes pertenecientes a las familias de *La Safor* segregaron la mutación p.K1729del en *MYH7* conocida por producir la miopatía de Laing. Los estudios de haplotipos indicaron que dicha mutación es fundadora y tiene un origen ancestral común con la familia Italo-Americana descrita por Hedera y col. En las familias restantes un ligamiento con *MYH7* es posible, aunque todavía no se ha identificado la mutación causal.

Distal myopathies are a heterogeneous group of inherited muscle disorders, relatively prevalent in the *Comunidad Valenciana*, Spain. This thesis is the study of patients with a dominant inherited distal anterior myopathy, from seven families, four of them originating from *La Safor* region. Initially, the pedigrees were prepared and patients were clinically evaluated. The association with neuropathy and/or cardiomyopathy was considered. To further characterize the disease, muscle imaging, neurophysiological and muscle biopsy studies were performed. Genetic assessment included sequencing and haplotyping studies. Patients from different families harboured a similar phenotype, depending on the degree of severity of the disease, though a large interindividual variability, intrafamilial and interfamilial, was evident. Although the involvement of the anterior compartment of the lower leg was the hallmark of the disease, some patients harboured different clinical phenotypes including limb-girdle or scapulo-peroneal syndromes. A homogeneous pattern of muscle involvement and the frequent involvement of limb girdle and axial muscles were corroborated by muscle imaging techniques. The association with neuropathy was ruled out although neurogenic features, probably related to an abnormal motor unit remodeling process, were found. The presence of cardiomyopathy only in one patient made this association possible but rare. Fibre type 1 predominance and hypotrophy, irregular enzyme activity with core/multi-minicore structures and mitochondrial abnormalities were the most consistent pathological findings. All patients from *La Safor* segregated the p.K1729del mutation in *MYH7*, known to cause Laing myopathy. Haplotype studies indicate that p.K1729del mutation in *La Safor* patients indeed is a common founder mutation. A common ancestral origin with the Italian-American family reported by Hedera et al is suggested. In patients from outside *La Safor*, the haplotypes showed a possible linkage of the myopathy with *MYH7* gene, although any mutation has still not been identified.

A. INTRODUCCIÓN

1. DEFINICIÓN DE MIOPATÍA DISTAL

Las miopatías distales constituyen un grupo heterogéneo de miopatías caracterizadas por una afectación preferente y a menudo selectiva de la musculatura distal de las extremidades¹. Por tanto, a diferencia de la mayoría de enfermedades musculares que producen debilidad proximal, las miopatías distales se caracterizan por debilidad y atrofia de inicio en las manos, antebrazos, piernas o pies.

La mayoría de miopatías distales son distrofias musculares hereditarias pero otras entidades, como algunas miopatías inflamatorias y metabólicas, pueden también presentarse con un fenotipo distal².

2. ESTRUCTURA DEL SARCÓMERO

El sarcómero es la unidad contráctil fundamental del músculo estriado³. Se trata de un complejo constituido por múltiples proteínas las cuales interaccionan mutuamente de forma muy precisa. Dichas proteínas cumplen tres funciones básicas: contráctil, reguladora y estructural.

La actina y la miosina son las proteínas contráctiles, constituyentes de los filamentos finos y gruesos, respectivamente. La troponina y la tropomiosina son las principales proteínas reguladoras. Por otro lado, la estructura del sarcómero es integrada y estabilizada por proteínas estructurales, las cuales se asocian con la actina y la miosina. Entre ellas, las *miosin-binding proteins* (MYBP-C) ayudan a fijar la estructura de los filamentos de miosina, contribuyen a la organización precisa de los filamentos durante la miofibrillogénesis y también modulan la contracción en el músculo cardíaco. Las *capping proteins* (CapZ= β -actinina y tropomodulina) se unen a los filamentos de actina y previenen la polimerización y despolimerización de esta proteína polimérica, lo cual contribuye a mantener la longitud correcta de los filamentos necesaria para una contracción eficiente.

Las líneas M y Z contienen *cross-linking proteins*, como la α -actinina, las cuales enlazan los filamentos gruesos y finos de forma tridimensional. Los filamentos intermedios ligados a las líneas Z y M refuerzan la estructura del sarcómero y vinculan los sarcómeros adyacentes. Están formados por proteínas como la desmina y la vimentina.

Finalmente, las proteínas gigantes titina y nebulina precisan el ensamblaje de los filamentos gruesos y finos en el sarcómero y a su vez la titina juega un papel crítico en la contracción.

Miosina

El papel de la miosina en la contracción muscular es clave, ya que es el constituyente principal de los filamentos gruesos y funciona como un motor molecular que convierte energía química en fuerza mecánica. Por tanto, es un enzima y una proteína estructural al mismo tiempo³.

La miosina es una proteína hexamérica compuesta por 2 subunidades de cadenas pesadas de miosina (MyHC), de aproximadamente 223 kDa de peso molecular, y 2 pares de subunidades ligeras de miosina, de 20 kDa. La MyHC tiene dos dominios funcionales: uno globular, que se corresponde con la doble cabeza amino-terminal de la proteína, y otro α -helicoidal que se corresponde con la cola carboxi-terminal. Al dominio globular se ligan las cadenas ligeras y cumple funciones motoras. Por el contrario, la cola de la MyHC participa en la formación de filamentos.

Cuando la miosina se somete a digestión enzimática se obtienen dos fragmentos, uno constituido prácticamente en su totalidad por la cola, denominado meromiosina ligera (LMM) y otro, conocido como meromiosina pesada (HMM), formado por las dos cabezas y un segmento corto de la cola. A su vez, la meromiosina pesada puede digerirse en 2 sub-fragmentos, S1 formado por las dos cabezas y S2, constituido por el segmento corto de la cola.

La miosina está compuesta por diferentes isoformas de MyHC, dependiendo del tejido y del estadio evolutivo, siendo la MyHC β -cardíaca, proteína codificada por el gen *MYH7*, el componente estructural fundamental de la miosina en fibras musculares esqueléticas tipo 1 (fibras lentas) y a su vez en miocardiocitos.

No obstante, existen otras isoformas de MyHC, codificadas por genes diferentes, que se expresan en otros tipos celulares, como por ejemplo fibras musculares esqueléticas tipo 2 (MyHC tipo II), miocardiocitos del atrio (MyHC α -cardíaca), fibras musculares lisas (MyHC músculo liso) y extraoculares (MyHC extraocular); o en otros estadios del desarrollo, como la MyHC embriónica o la MyHC perinatal⁴.

3. CLASIFICACIÓN DE LAS MIOPATÍAS DISTALES

Desde su descripción inicial por William Richard Gowers⁵ en 1902 se han producido notables avances en el conocimiento de las miopatías distales en relación a aspectos clínicos y fisiopatológicos⁶.

En la última década, el desarrollo de la biología molecular ha permitido conocer la base genética de la mayoría de las entidades que se engloban en este grupo de enfermedades musculares y ha revolucionado el sistema de clasificación de las mismas^{6,7,8}. De este modo en la actualidad las miopatías distales se categorizan en base a la edad de inicio, patrón clínico, modo de herencia y defecto genético.

En la tabla 1 se detallan los diferentes tipos de miopatía distal y a continuación se describen las formas más relevantes.

Tabla 1. Clasificación de las miopatías distales.

| Tipo | Edad de inicio | Debilidad inicial | Herencia | Gen/ locus |
|---|----------------|--------------------------------|----------|----------------------|
| Miopatía distal de Laing (MPD1) | 1-25 | CAP | AD | MYH7, 14q |
| Miopatía distal por nebulina (DNM) | 2-15 | CAP | AR | NEB, 2q21 |
| Miopatía distal de Udd (TMD) | >35 | CAP | AD | TTN, 2p31 |
| Miopatía de Nonaka (IBMh) | 15-30 | CAP | AR | GNE, 9p1-q1 |
| Miopatía de Miyoshi | 15-30 | CPP | AR | DYSF, 2p13 |
| Miopatía distal de Welander | >40 | Manos/ extensores dedos | AD | 2p13 |
| Miopatía de Markesbery-Griggs (Zaspopatía) (MFM) | 40-60 | CPP/ manos | AD | ZASP, 10q |
| Miopatía distal con debilidad vocal y faríngea (MPD2) | 35-60 | CLP/ manos/ disfonía | AD | MATR3, 5q31 |
| Desminopatía (MFM) | 15-40 | CAP/ antebrazo | AD | Desmina, 2q35 |
| Miotilinopatía distal (MFM) | 40-60 | CPP/manos | AD | Miotilina, 5q31 |
| Miopatía distal con pies cavos y arreflexia | 15-50 | CAP y CPP/ disfonía y disfagia | AD | 19p13 |
| Miopatía distal MPD3 | 30-45 | Manos/ CAP | AD | 8p22-q11 y 12q13-q22 |

Abreviaturas: AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo; CAP, compartimento anterior de la pierna; CLP, compartimento lateral de la pierna; CPP, compartimento posterior de la pierna; MFM, miopatía miofibrilar.

a. Miopatía distal de Laing

En 1995 Laing y colaboradores describieron esta forma de miopatía⁹, en una familia australiana que presentaba un fenotipo similar al primer paciente descrito por Gowers a principios del siglo XX. En éste trabajo se realizaron estudios genéticos que ligaron esta enfermedad al cromosoma 14, pero no fue hasta 2004 cuando Meredith y colaboradores¹⁰ descubrieron que la enfermedad se produce por mutaciones en el gen de la cadena pesada de la miosina lenta (gen *MYH7*), que codifica una proteína sarcomérica: la cadena pesada de la miosina I (MyHC I). Ésta es la segunda proteína que se ha implicado en la patogenia de las miopatías distales.

El patrón de herencia de la miopatía de Laing es autosómico dominante y se caracteriza por un inicio temprano, en la infancia, produciendo debilidad en musculatura extensora del pie y tobillo. Evolutivamente se ha descrito la implicación de músculos extensores de muñeca y dedos, musculatura flexora del cuello y proximal de las extremidades^{11,12}.

Se caracteriza a su vez por una progresión lenta y gradual, resultando en un grado de discapacidad moderado ya que todos los pacientes descritos conservaban la deambulación incluso en edades avanzadas¹².

b. Miopatía de Miyoshi

Esta entidad fue descrita por primera vez en Japón, aunque con posterioridad se ha identificado en diversos grupos étnicos, y probablemente es una de las formas de miopatía distal más frecuente⁷.

El patrón de herencia de esta miopatía es autosómico recesivo y se produce por mutaciones en el gen que codifica la disferlina, una proteína sarcolémica, localizado en el cromosoma 2p12-14^{13,14}.

Debuta entre los 15 y los 40 años de edad, afectando típicamente a músculos del compartimento posterior de la pierna, fundamentalmente a los *gastrocnemius*. No obstante, inicialmente las pantorrillas pueden ser hipertróficas. Clínicamente es frecuente que el paciente refiera mialgias e intolerancia al ejercicio y es característica la detección de cifras muy elevadas de creatín quinasa (CK) sérica. En etapas más avanzadas la enfermedad afecta a la musculatura tibial anterior y a grupos musculares proximales, lo cual condiciona el confinamiento del paciente en silla de ruedas después de 10-15 años de evolución.

La miopatía de Miyoshi es alélica con la distrofia de cinturas 2B¹⁵ (LGMD2B). Además, mutaciones en el gen de la disferlina pueden ocasionar una afectación distal pero predominantemente de la musculatura del compartimento anterior de la pierna¹⁶ y recientemente se han descrito nuevos fenotipos clínicos que oscilan desde

una hiperCKemia asintomática hasta un patrón clínico pseudometabólico, así como la existencia de portadores sintomáticos^{17,18}.

Asimismo se ha ampliado el espectro de edad de inicio de las disferlinopatías. Por un lado se ha comunicado una familia con una forma de inicio congénito, expresada como hipotonía desde el nacimiento junto con debilidad pelviana y de musculatura flexora del cuello¹⁹ y en contraposición, se ha reportado un caso esporádico con inicio de los síntomas por encima de los 70 años, con clínica de rigidez muscular en tronco y extremidades inferiores inducida por la actividad física²⁰.

c. Miopatía distal de Udd

También conocida como distrofia muscular tibial (TMD), esta miopatía se ha ligado a mutaciones en el gen que codifica la titina, localizado en el cromosoma 2q31-33^{21,22}. Éste hallazgo constituyó el primer defecto genético identificado como causa de una distrofia distal autosómico dominante.

La titina es una proteína sarcomérica gigante que actúa como ligando de la calpaína-3. A su vez, mutaciones de esta proteína en homocigosis se asocian con un fenotipo de cinturas (LGMD2J), mucho más grave clínicamente⁷.

La miopatía distal de Udd normalmente debuta después de los 35 años de edad, afectando inicialmente a la musculatura del compartimento anterior de la pierna, lo cual condiciona el desarrollo de un pie caído. Su progresión es lenta, pudiendo conllevar debilidad proximal en edades avanzadas, pero excepcionalmente el paciente queda confinado en silla de ruedas.

A su vez, de forma excepcional implica a la musculatura extensora del antebrazo produciendo debilidad en la extensión de muñeca y dedos, a diferencia de otra forma de miopatía distal frecuente en los países nórdicos, conocida como miopatía de Welander⁷.

d. Miopatía de Nonaka

Es una forma de miopatía distal, con herencia autosómico recesiva, que afecta a adultos jóvenes, también conocida como miopatía por cuerpos de inclusión hereditaria (AR-hIBM), IBM2 o miopatía autosómico recesiva que respeta al cuádriceps²³.

Desde su descripción inicial en Japón por Nonaka y colaboradores²⁴ se han publicado numerosas mutaciones diferentes en el gen *GNE* (*N-acetylglucosamine 2 epimerasa/N-acetylmannosamine kinase gene*), una de ellas, V572L, con efecto fundador^{25,26}.

El fenotipo clínico es muy parecido a la miopatía de Markesbery-Griggs-Udd, pero con un debut más temprano. La debilidad se inicia entre los 10 y los 40 años, afectando a la musculatura tibial anterior condicionando el desarrollo de un pie caído bilateral. La musculatura del compartimento posterior y la musculatura proximal se afectan más tardíamente y particularmente se respeta el músculo cuádriceps incluso en fases avanzadas^{23,6,7}.

A nivel patológico es característico el hallazgo de vacuolas ribeteadas, las cuales no son patognomónicas de esta entidad ya que aparecen en otras formas de miopatía²⁷.

e. Miopatía de Welander

Fue inicialmente descrita en Suecia por Lisa Welander en 1951, como “*miopatía distalis tarda hereditaria*”²⁸. Es la forma más frecuente de miopatía distal en este país, con una prevalencia de 5/10⁵ habitantes y también es frecuente en Finlandia²⁹. En otros países sólo se han descrito casos esporádicos³⁰. Se hereda con un patrón autosómico dominante.

Los síntomas iniciales comienzan entre los 40 y los 60 años de edad afectando en primer término a la musculatura de las manos. Con los años la debilidad se extiende

a las piernas, condicionando el desarrollo de un pie caído y una marcha en estepaje⁷ por debilidad de la musculatura tibial anterior.

f. Miopatía de Markesbery-Griggs

Esta miopatía se describió en 1974, en una familia afectada con un patrón autosómico dominante³¹.

Clínicamente se caracteriza por implicar a la musculatura tibial anterior entre los 43 y los 51 años de edad, con posterior debilidad afectando a la musculatura intrínseca de las manos y extensora de muñeca.

Los estudios genéticos la ligaron erróneamente al locus de la titina³², pero tras la secuenciación completa de este gen no se encontraron mutaciones. Recientemente, y en base a los hallazgos patológicos compatibles con una miopatía miofibrilar se ha descubierto que el defecto genético se encuentra en el gen *ZASP*, que codifica la proteína ZASP, la cual es un componente del disco Z³³.

g. Miopatía distal por mutaciones en la nebulina

Se trata de una forma de miopatía distal autosómico recesiva de reciente descripción por Carina Wallgren-Pettersson y colaboradores³⁴.

Su debut ocurre en la infancia o en el adulto joven, y el fenotipo clínico recuerda a la miopatía distal de Laing, ya que afecta preferentemente a la musculatura tibial anterior, extensora de dedos y flexora del cuello.

Es alélica con una forma de miopatía congénita, la miopatía nemalínica, entidad de mayor gravedad clínica caracterizada a nivel patológico por la formación de cuerpos nemalínicos, los cuales son agregados del disco Z y de proteínas constituyentes de filamentos finos.

h. Miopatías miofibrilares

Éstas miopatías se han descrito bajo diversos términos: miopatías miofibrilares, miopatías tipo “*surplus*” (depósito) o miopatías relacionadas con la desmina.

Se caracterizan por presentar unos rasgos patológicos comunes, consistentes en la desintegración del sarcómero, el acúmulo de proteínas de degradación miofibrilar y la expresión ectópica de múltiples proteínas del disco Z y otras proteínas como la distrofina³⁵.

Aunque morfológicamente son homogéneas, genéticamente destaca su heterogeneidad, ya que se han descrito mutaciones en diversos genes como causa de las mismas, destacando los defectos génicos en el gen de la desmina, miotilina, $\alpha\beta$ -cristalina, filamina C y ZASP⁷.

Es de relevancia, que frecuentemente, a la afectación esquelética distal, se asocia miocardiopatía, neuropatía y/o debilidad de la musculatura respiratoria.

i. Miopatía distal con debilidad vocal y faríngea (MPD2)

Ésta miopatía fue descrita en 1998 en una familia norteamericana³⁶.

El debut ocurre en la edad adulta y el patrón de herencia es autosómico dominante. Se caracteriza porque a la afectación de la musculatura distal se suma de forma característica debilidad de cuerdas vocales y musculatura faríngea, con preservación de la musculatura ocular, lo que la diferencia de la distrofia oculofaríngea (OPMD).

Los niveles de CK pueden ser normales o elevarse 8 veces por encima de lo normal y a nivel patológico son típicas, pero no patognomónicas, las vacuolas ribeteadas.

Recientemente, la identificación de una nueva familia procedente de Bulgaria, con un fenotipo similar a la primera familia descrita, ha permitido identificar el defecto genético subyacente, localizado en el gen *MATR3*³⁷, que codifica una proteína nuclear: la matrina 3.

j. Fenocopias de miopatías distales.

En este apartado se incluyen ciertas distrofias musculares, algunas de ellas bastante prevalentes, que pueden manifestarse con un cuadro miopático de predominio distal, entre ellas cabe destacar la distrofia miotónica de Steinert, la cual supone la forma distal más frecuente; la distrofia facio-escápulo-humeral (FSHD) y la distrofia muscular de cinturas tipo calpaína (LGMD2A).

4. INTERÉS ACTUAL DEL TEMA

Las miopatías distales son un grupo heterogéneo de enfermedades musculares las cuales suponen un reto desde el punto de vista clínico y genético. La mayoría de ellas se producen por mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas o asociadas al sarcómero, como la desmina, en contraposición a las distrofias de cinturas, cuya fisiopatología se basa en mutaciones de genes que codifican proteínas del sarcolema⁷. No obstante, en la génesis de las miopatías distales también se han implicado proteínas no relacionadas con el sarcómero, como la disferlina, que participa en la reparación de la membrana¹⁵ y la GNE, que es un enzima del metabolismo del ácido siálico³⁸.

Los avances en biología molecular han permitido caracterizar genéticamente a la mayoría de miopatías distales. Sin embargo todavía quedan miopatías distales en las que no se conoce el defecto molecular, como la miopatía de Welander, la cual se ha ligado a un locus en el cromosoma 2p13, pero tras más de 10 años de laboriosos estudios no se ha conseguido aislar el gen implicado³⁹⁻⁴¹. Además, aunque la mayoría de las miopatías distales son hereditarias se han descrito algunas formas esporádicas producidas por mutaciones *de novo*¹⁰, como por ejemplo en la miopatía distal de Laing.

Cabe destacar el papel de la patología en la búsqueda del gen y del producto proteico implicados en la génesis de las miopatías distales. Es el caso de la miopatía distal clásicamente descrita por Markesbery, en la cual, tras años de infructuosos

estudios genéticos fueron los hallazgos morfológicos en la biopsia muscular, propios de una miopatía miofibrilar, los que orientaron la búsqueda del gen candidato, el cual codifica una proteína del disco Z, la proteína ZASP³³.

Uno de los aspectos más fascinantes, puesto en relevancia por la biología molecular, es que defectos en el mismo gen pueden producir fenotipos muy diversos, no solo distales, sino también resultando en un patrón de cinturas o superponiéndose con miopatías por cuerpos de inclusión^{6,7}. Por ejemplo, se ha llegado a la conclusión de que la miopatía distal de Nonaka es alélica con la miopatía por cuerpos de inclusión hereditaria que respeta el cuadriceps (IBM2)²³. A su vez, la miopatía distal de Miyoshi es alélica con la distrofia de cinturas tipo 2B (LGMD2B), y ambos fenotipos pueden expresarse indistintamente en miembros de la misma familia^{42,43}.

Otro aspecto a destacar, es que aunque tradicionalmente las miopatías distales han sido consideradas raras, en determinados grupos étnicos y ciertas áreas geográficas pueden constituir la enfermedad muscular más prevalente. Este es el caso de la miopatía de Welander en Suecia o la miopatía distal de Udd en determinadas áreas de Finlandia⁷.

En nuestro medio, las miopatías distales son relativamente prevalentes, ya que constituyen aproximadamente un 10% del registro de miopatías en la *Unidad de Patología Neuromuscular* del Hospital Universitario La Fe. Dicha prevalencia junto con la complejidad de su abordaje diagnóstico y la posibilidad en la actualidad de caracterizarlas genéticamente, ha despertado el interés por el estudio de este grupo de miopatías.

A este respecto, en nuestro área destaca la relativa alta prevalencia de disferlinopatía en pacientes procedentes de Sueca, causada por una mutación con carácter fundador y expresada bajo diversos fenotipos: distal posterior, distal anterior y cinturas⁴³.

Por otro lado, la heterogeneidad fenotípica de las miopatías distales junto con la expresión de rasgos comunes a otras enfermedades neuromusculares ha supuesto que durante años fueran infradiagnosticadas y/o englobadas dentro de otras entidades diagnósticas.

El estudio y la correcta categorización genética de estas miopatías permitirán avanzar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en su génesis, emplear medidas de consejo genético para evitar su transmisión de generación a generación y aplicar terapias en el momento en que se desarrollen.

5. ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE LAS MIOPATÍAS DISTALES

A pesar de que el abordaje diagnóstico de las miopatías distales se ha revolucionado con el desarrollo de la genética molecular sigue siendo imprescindible una cuidadosa anamnesis, con recogida de los antecedentes familiares lo que permitirá la elaboración del árbol familiar, y una minuciosa evaluación clínica, con especial atención sobre el patrón de afectación muscular y el curso clínico.

A este respecto, es útil definir el fenotipo clínico, con especial hincapié sobre la edad de inicio, progresión, afectación predominante de extremidades superiores o inferiores⁶ y grupos musculares implicados. Por ejemplo, la miopatía de Welander es una de las formas de miopatía distal en las que la debilidad y atrofia muscular comienzan en las manos, mientras que en la mayoría de las miopatías distales las piernas se afectan precozmente.

Otras pruebas diagnósticas empleadas en la valoración de pacientes afectados de una miopatía distal son, como en otras miopatías, los niveles de CK sérica, los estudios electrofisiológicos, las técnicas de imagen muscular, la biopsia muscular y los estudios genéticos.

a. Analítica sanguínea

Respecto a los niveles de CK sérica, éstos pueden ser normales o moderadamente elevados, con la excepción de la miopatía de Miyoshi, que se caracteriza por cursar con valores de CK muy altos en fases preclínicas e iniciales⁶.

En relación a las disferlinopatías, se ha descrito un método diagnóstico que consiste en analizar la expresión de disferlina en monocitos obtenidos a partir de una muestra de sangre periférica⁴⁴, lo cual permite obviar la realización de la biopsia muscular.

b. Estudios neurofisiológicos

Los estudios electrofisiológicos sirven para diferenciar un proceso miopático de otro neurógeno. Por definición, las velocidades de conducción nerviosa en las miopatías son normales. No obstante, en ocasiones puede encontrarse una disminución de la amplitud del potencial de acción motor secundario a la atrofia muscular distal.

El patrón electromiográfico típico de una miopatía mostrará potenciales de unidad motora polifásicos, de pequeña amplitud y duración, con un patrón de reclutamiento interferencial precoz⁴⁵. No obstante, en los casos en los que la miopatía está muy avanzada y por consiguiente la pérdida de fibras musculares es acusada, resultará en un patrón de reclutamiento simplificado, similar al que encontramos en procesos neurógenos.

Además, en algunos pacientes se puede objetivar actividad espontánea en reposo, en forma de fibrilaciones, ondas positivas e incluso descargas repetitivas complejas. Estas últimas son frecuentes en las desminopatías.

Por otro lado, la estimulación repetitiva y los estudios de monofibra pueden emplearse si se plantea el diagnóstico diferencial con trastornos de la transmisión neuromuscular, como la *miastenia gravis*.

c. Técnicas de imagen muscular

Las técnicas de imagen muscular engloban la tomografía axial computerizada (TAC) y la resonancia magnética (RM).

En la actualidad se emplean de forma rutinaria en el abordaje del paciente con miopatía distal ya que permiten determinar con exactitud el patrón de afectación muscular. Por ejemplo, es característica la afectación selectiva de la musculatura tibial anterior en la miopatía distal de Laing, la miopatía distal de Udd y la miopatía distal por mutaciones en el gen de la nebulina, mientras que en la miopatía distal de Miyoshi el compromiso predomina en la musculatura del compartimento posterior de la pierna y en ocasiones se acompaña de mioedema^{7,46,47}.

Asimismo las técnicas de imagen muscular permiten la identificación de músculos moderadamente afectados, ideales para biopsiar porque aún el tejido muscular no ha sido reemplazado por tejido fibro-adiposo⁶.

d. Técnicas patológicas

La biopsia muscular permite obtener muestras de tejido muscular para su posterior análisis.

Aunque la mayoría de alteraciones patológicas son inespecíficas y comunes a cualquier miopatía, como por ejemplo la variación del tamaño de las fibras, el predominio de núcleos centrales, el incremento del tejido fibro-adiposo y la presencia de fibras necróticas y regenerativas, existen otros datos que pueden orientar hacia una miopatía distal. Por ejemplo, en muchas de las miopatías distales incluyendo la miopatía distal de Welander, la miopatía distal de Udd y la miopatía distal de Nonaka, las fibras musculares contienen vacuolas, algunas de ellas ribeteadas⁷. Debido a este hallazgo algunas de estas entidades se habían englobado dentro de las miopatías hereditarias por cuerpos de inclusión. A nivel ultraestructural, las vacuolas ribeteadas son inclusiones citoplasmáticas filamentosas de 16 a 21 nm de diámetro⁴⁸.

Por el contrario, la miopatía distal de Miyoshi carece de vacuolas y presenta un patrón más distrófico, a menudo con infiltrados inflamatorios y sobre-expresión en las fibras musculares de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I⁴⁹. En relación a la miopatía distal de Laing, se han descrito cambios patológicos variables e inespecíficos, siendo infrecuentes las vacuolas¹².

Por otro lado, los hallazgos patológicos dependen también del músculo biopsiado, fundamentalmente en relación al grado en que dicho músculo se ve implicado en la enfermedad, de modo que un músculo gravemente afecto usualmente muestra cambios de estadio final en contraposición a un músculo relativamente preservado, el cual sólo presentará leves cambios miopáticos, a menudo inespecíficos.

Adicionalmente a las técnicas histoquímicas, la detección de proteínas mediante Western Blot es útil en algunas de las miopatías distales, como es el caso de la miopatía distal de Miyoshi⁵⁰, siendo su rendimiento diagnóstico mayor que el de las técnicas de inmunohistoquímica, ya que los anticuerpos anti-disferlina tiñen débilmente incluso en músculos sanos, con lo cual se dificulta la diferenciación entre una expresión normal y otra reducida de esta proteína. Así mismo, en mutaciones de la titina se ha descrito una disminución secundaria de la calpaína-3, detectada por inmunoblot, en diferente grado, de forma que en homocigotos LGMD2J la calpaína-3 disminuye de forma muy marcada, a diferencia de pacientes heterocigotos con fenotipo TMD^{7,51}. Ello se debe a que la calpaína-3 actúa como ligando de la porción C-terminal de la titina en el músculo.

e. Genética molecular

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha supuesto una revolución en el abordaje diagnóstico de las miopatías distales.

No obstante, en la práctica clínica la aplicación de técnicas genéticas no es factible de forma rutinaria en la mayoría de centros, debido al gran tamaño y la complejidad de los genes implicados en su génesis, quedando restringido su uso a laboratorios

pioneros en investigación en este campo. Por ejemplo, la titina es la proteína humana de mayor tamaño y está codificada por 363 exones²²; el gen de la miosina β -cardíaca (MYH7) cuenta con 40 exones¹⁰ y el gen de la disferlina con 55 exones⁵².

Aunque en algunas miopatías las mutaciones se concentran en una zona restringida del gen, como es el caso de la miopatía de Laing a nivel de los últimos 5 exones o de las titinopatías, en el extremo C-terminal, en otras entidades como la miopatía de Nonaka (IBM2) se han descrito mutaciones a lo largo de todo el gen GNE⁶.

Por otro lado, en ocasiones se encuentran casos aislados, lo cual puede deberse a una herencia autosómico recesiva o a mutaciones *de novo*. Esto se ha descrito en la miopatía distal de Laing, en la que se han reportado casos esporádicos debidos a mutaciones *de novo*, como se ha apuntado anteriormente.

Como recomendación general en la práctica clínica, antes de abordar estudios genéticos complejos se recomienda descartar deleciones de la distrofia facio-escápulo-humeral, dado que pueden producir fenotipos pleomórficos, incluyendo fenotipos distales⁵³.

6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial de las miopatías distales abarca numerosas entidades.

En una primera instancia, debido al patrón de afectación distal, las miopatías distales deben diferenciarse de neuropatías y enfermedades de motoneurona, como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y la atrofia muscular espinal distal. Nos ayudan en esta distinción ciertos hallazgos de la exploración neurológica, como lo es el hecho de que el músculo *extensor digitorum brevis* se preserve en las miopatías y datos de los estudios electrofisiológicos⁷.

Por otro lado, existen otras miopatías que también afectan la musculatura distal, anteriormente mencionadas en el apartado 3.j, que aborda las fenocopias de miopatías distales.

Entre ellas destaca la distrofia miotónica y la distrofia facio-escápulo-humeral junto con los síndromes escápulo-peroneales. A su vez, la miopatía amiloidea puede presentarse con debilidad exclusivamente a nivel distal⁵⁴, al igual que las miopatías inflamatorias, especialmente la miopatía por cuerpos de inclusión. En dichas entidades la biopsia muscular cobra gran interés en el diagnóstico, ya que permitirá identificar respectivamente los depósitos de material amiloide y los infiltrados inflamatorios. No obstante, hay que tener en cuenta que en algunas miopatías distales podemos encontrar fenómenos inflamatorios, especialmente en la miopatía de Nonaka y en las disferlinopatías.

Con todo ello, es evidente que el diagnóstico de este grupo de miopatías suponga un reto para el neurólogo.

B. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En nuestro medio las miopatías distales constituyen una patología relativamente prevalente y un grupo de ellas, fundamentalmente aquellas con una afectación selectiva del compartimento anterior de la pierna, está sin caracterizar. La mayoría de pacientes con este fenotipo clínico presentan antecedentes familiares compatibles con una herencia autosómico dominante.

El estudio en profundidad de estas enfermedades a nivel clínico, morfológico y molecular es la vía para conseguir una correcta caracterización de las mismas y poder descubrir las funciones biológicas y los mecanismos celulares alterados en cada una de estas entidades.

El avance en el conocimiento de este grupo de enfermedades neuromusculares repercutirá en una mejora en el manejo clínico, posibilitará la aplicación del consejo genético y podría contribuir a la investigación de terapias.

C. OBJETIVOS

Estudiar una serie de enfermos afectos de una forma de miopatía distal prevalente en Valencia, de herencia autosómico dominante y que afecta predominantemente a la musculatura del compartimento anterior de la pierna, con la finalidad de:

- 1. Describir las manifestaciones clínicas y definir de forma precisa el patrón de afectación clínica.*
- 2. Estudiar la variabilidad fenotípica entre miembros de la misma familia y entre diferentes familias con la misma forma de miopatía distal.*
- 3. Analizar el curso de la enfermedad y valorar la posible implicación del miocardio en el pronóstico de la misma.*
- 4. Describir los hallazgos neurofisiológicos y los patrones de afectación muscular mediante técnicas de imagen.*
- 5. Analizar los hallazgos de la biopsia muscular.*
- 6. Caracterizar genéticamente esta entidad mediante estudios de genética molecular.*

D. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio observacional, descriptivo y comparativo de las características clínicas y de pruebas diagnósticas, sobre un grupo de pacientes afectos de una forma de miopatía distal de herencia autosómico dominante y afectación predominante del compartimento anterior de la pierna.

Se han consultado las bases de datos de la consulta de la *Unidad de Patología Neuromuscular* del Hospital Universitario La Fe de Valencia para extraer los casos índices que cumplieran los criterios de inclusión. También se han incluido de forma consecutiva aquellos pacientes remitidos a la consulta durante los tres años en los que se ha desarrollado este estudio, diagnosticados *de novo*, que cumplieran los criterios de selección. A partir de estos casos índices se ha contactado con otros miembros de la familia para su evaluación de forma consecutiva.

Por ello, el estudio se ha estructurado en dos partes, una de ellas retrospectiva, basada en el análisis de los datos disponibles de la casuística presente y una prospectiva, de modo que de forma protocolizada se ha procedido a la reevaluación de casos índices, se han confeccionado y ampliado los árboles genealógicos y se han estudiado casos secundarios.

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario La Fe de Valencia (Anexo I).

Así mismo, se ha elaborado un protocolo de recogida de datos de los sujetos evaluados en el estudio (Anexo II). En el Anexo III se recoge la Hoja Informativa al Paciente para Proyectos de Investigación, empleada para este estudio.

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Tras realizar la anamnesis y una exploración clínica, los sujetos evaluados se han clasificado en 3 grupos: afectos, sanos y clínicamente indeterminados.

1.1. PACIENTES

1.1.1. Criterios de inclusión

Se han incluido en el estudio sujetos que cumplieran los siguientes requisitos:

- a. Pacientes afectos de una miopatía distal con afectación predominante de la musculatura del compartimento anterior de la pierna.
- b. Patrón de herencia autosómico dominante.

1.1.2. Criterios de exclusión

Se han excluido aquellos pacientes que cumplieran alguno de estos supuestos:

- a. Casos en los que el estudio electrofisiológico mostró un patrón neurógeno altamente sugestivo de neuropatía y casos en los que aparecían ráfagas miotónicas típicas de la distrofia miotónica.
- b. Casos en los que en la biopsia muscular se detectó un déficit o anomalía en una proteína estructural mediante técnicas de inmunohistoquímica y/o inmunoblot, como por ejemplo la distrofina, sarcoglicanos o la merosina, excluyendo la calpaína-3, proteína que puede alterarse de forma secundaria en diversas miopatías.
- c. Casos en los que se demostró una mutación genética específica, particularmente de distrofia miotónica de Steinert, distrofia facio-escápulo-humeral y distrofia de cinturas tipo calpaína (LGMD2A).

1.2. GRUPO DE INDIVIDUOS SANOS

Constituido por miembros no afectados pertenecientes a las familias que son objeto del presente estudio, los cuales han querido colaborar de forma voluntaria. Todos ellos han sido evaluados mediante un protocolo de recogida de datos y explorados de forma minuciosa antes de ser catalogados como sanos. El interés de contar con la participación de individuos sanos genéticamente relacionados con los pacientes radica en la posibilidad de realizar estudios genéticos de ligamiento.

1.3. GRUPO DE INDIVIDUOS CLÍNICAMENTE INDETERMINADOS

En este grupo se incluyen aquellos miembros de las familias objeto del presente estudio que referían síntomas inespecíficos y/o presentaban mínimos signos clínicos, y por ello tras la evaluación clínica no fue posible determinar si padecían o no la miopatía, ya que podrían tratarse de casos presintomáticos o con expresión parcial de la enfermedad.

2. VARIABLES DEL ESTUDIO

2.1. DATOS DEMOGRÁFICOS

Se han recogido en todos los individuos del estudio.

a. Cronológicos

Se han estudiado 4 variables cuantitativas, medidas en años:

- Edad en el momento del estudio.
- Edad de inicio de los síntomas.
- Edad a la que los pacientes consultaron por síntomas derivados de la miopatía.
- Edad de fallecimiento.

b. Género

Variable cualitativa dicotómica: hombre/mujer.

2.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Se han valorado en todos los individuos del estudio e incluyen:

a. Estado clínico

- Afecto.
- Sano.
- Clínicamente indeterminado.

b. Síntomas

Se recogen los síntomas producidos por la miopatía y síntomas relacionados con la misma.

- Síntomas motores:
 - Negativos: disminución de la fuerza muscular, especificando el grupo muscular donde el paciente aqueja la debilidad.
 - Positivos: calambres musculares (son contracciones musculares involuntarias dolorosas, de segundos a minutos de duración, expresión de la descarga de varias unidades motoras).
- Síntomas sensitivos:
 - Negativos: disminución de la sensibilidad táctil expresada como sensación de acorchamiento o adormecimiento y de la sensibilidad térmica.
 - Positivos: parestesias, disestesias o hiperpatía.

- Alteración de la deambulación:
Modificación del patrón normal de la marcha referido subjetivamente por el paciente, en forma de marcha patosa o peculiar.
- Otros:
 - Presencia de adelgazamiento muscular (atrofia) y su distribución.
 - Desarrollo de pie caído.
 - Mialgias: dolor muscular, local o difuso, relacionado o no con la actividad física.
 - Cansancio-fatiga muscular.

c. Exploración neurológica, fenotipo y curso clínico

La exploración neurológica se ha realizado en todos los sujetos participantes del estudio incluyendo individuos afectados, sanos e indeterminados, de forma protocolizada en la mayoría de ellos (Anexo II), evaluándose específicamente los siguientes ítems:

- Valoración de la debilidad muscular por grupos y gradación en base a la escala del *Medical Research Council (MRC)*, aplicando la siguiente puntuación:
 - 5: fuerza normal
 - 4: contracción muscular contra gravedad y resistencia
 - 3: contracción muscular contra gravedad
 - 2: movimiento activo cuando se elimina la gravedad
 - 1: contracción muscular mínima, sin conseguir el desplazamiento de la articulación
 - 0: ausencia de contracción muscular o de movimiento
- Exploración de los reflejos de estiramiento muscular.

Se ha explorado los reflejos miotáticos bicipital, tricipital, estilo-radial, rotuliano y aquileo, bilateralmente, aplicando la siguiente puntuación:

- 2: normal
- 1: hipoactivo
- 0: ausente

- Presencia de deformidades y retracciones articulares.
- Exploración de la sensibilidad.

Se ha explorado tanto la sensibilidad superficial (tacto-algésica) como la profunda (vibratoria y posicional), aplicándose la siguiente puntuación:

- 2: normal
- 1: disminuida
- 0: ausente

- Descripción del patrón de marcha.
- Fenotipo clínico.

Se ha descrito el fenotipo clínico que presentan los pacientes, clasificándolos en 3 grupos: asintomáticos con signos clínicos en la exploración, afectación selectiva distal y fenotipo distal-proximal.

- Curso de la miopatía.

Se ha valorado la evolución de la miopatía en los pacientes durante el seguimiento.

d. Valoración de la discapacidad funcional

La escala de discapacidad modificada de Walton, Gardner y Medwin⁵⁵ se ha adaptado para evaluar el grado de discapacidad funcional, empleándose la siguiente puntuación:

- 0: movilidad normal
- 1: leve alteración de la marcha
- 2: incapaz de correr
- 3: marcha dificultosa pero autónoma
- 4: uso de bastón para la deambulaci3n
- 5: uso de muletas para la deambulaci3n
- 6: deambula con andador
- 7: silla de ruedas
- 8: encamado

2.3. LABORATORIO

Se ha determinado los niveles de CK sérica en los sujetos incluidos en el estudio.

En nuestro laboratorio el valor de normalidad de CK sérica está comprendido entre 0-145 UI/L.

2.4. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDÍACA

La posible afectación cardíaca se ha valorado en todos los sujetos participantes en el estudio mediante evaluación clínica. Adicionalmente, se ha procedido a la realización de ECG.

En algunos casos se ha completado el estudio mediante ecocardiografía y excepcionalmente ciertos sujetos se han sometido a una prueba de esfuerzo y/o coronariografía bajo indicación del Cardiólogo.

Dichos estudios se han realizado siguiendo los estándares habituales.

2.5. EVALUACIÓN DEL APARATO RESPIRATORIO

La valoración de la función respiratoria en los pacientes y en individuos clínicamente indeterminados se ha llevado a cabo a través de evaluación clínica en todos ellos.

Se ha procedido a la realización de pruebas funcionales respiratorias en aquellos casos en los que la evaluación clínica lo recomendará.

2.6. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

La evaluación neurofisiológica se ha practicado en los pacientes y en algunos sujetos clínicamente indeterminados.

Para ello se han estudiado las conducciones nerviosas sensitivas y motoras en al menos dos nervios periféricos de extremidades inferiores, con recogida de los valores de amplitud de los potenciales de acción sensitivos y de los potenciales de acción compuestos motores y cálculo de la velocidad de conducción.

A su vez, se ha llevado a cabo estudios electromiográficos en músculos distales y proximales de extremidades inferiores y superiores. Mediante la introducción de una aguja electrodo en el músculo se ha analizado la presencia patológica de actividad espontánea en el reposo, incluyendo las fibrilaciones, ondas positivas y descargas repetitivas complejas. También se han analizado los potenciales de acción de unidad motora (PUAM) voluntarios, teniendo en cuenta su morfología (duración, amplitud, fases), su estabilidad y las características de disparo (activación, reclutamiento y patrón de interferencia).

En algunos casos se ha procedido al cálculo de la densidad de fibras mediante estudio EMG de fibra aislada.

Los estudios de conducciones nerviosas y el electromiograma se han llevado a cabo siguiendo procedimientos convencionales.

2.7. MORFOLOGIA MUSCULAR (TAC/RM MUSCULAR)

Las pruebas de imagen muscular se han practicado en pacientes y algunos sujetos clínicamente indeterminados.

La evaluación de las imágenes obtenidas ha permitido describir los grupos musculares afectados, evaluar el tipo de alteración morfológica y gradar la afectación muscular.

Respecto a los cambios morfológicos, se ha valorado la alteración en la densidad (TAC) o intensidad de señal (RM) en el músculo secundaria al reemplazamiento de este tejido por material fibro-adiposo y a su vez, se han evaluado los cambios en el volumen muscular lo cual permite estimar la posible atrofia o hipertrofia de los vientres musculares.

El protocolo empleado para la evaluación de los pacientes con miopatía distal mediante RM, se detalla a continuación:

- El examen se ha llevado a cabo con sistemas de RM de 1.5T (Plataforma Excite GE, y Magnetom Avanto, Siemens). Ocasionalmente, después de Junio de 2007, se han practicado algunos estudios en un equipo de 3T (Magnetom Trio, Siemens).
- Las secuencias se han obtenido en el plano axial, perpendicular a la mayoría de vientres musculares, lo cual facilita su identificación.
- Se han utilizado dos secuencias:

a. Secuencias T1.

Es una secuencia ideal para mostrar la anatomía siendo útil para valorar los cambios de señal y volumen muscular.

b. Secuencias *STIR*.

Permiten valorar la existencia de “edema” muscular.

- Ambas secuencias se han obtenido en 6 segmentos:
 - a. Nivel cervical
 - b. Cintura escapular
 - c. Nivel toraco-abdominal
 - d. Cintura pelviana
 - e. Muslos
 - f. Piernas

- El grosor del corte y la separación se han ajustado en función del segmento estudiado y las características del paciente. Se han realizado 12 cortes en cada segmento. De forma estandarizada se ha fijado el grosor del corte y el espaciado entre los mismos, con ligeras variaciones en función del tamaño del paciente:
 - a. Segmento cuello:
 - grosor del corte: 5 mm
 - espaciado: 1 mm
 - b. Cintura escapular:
 - grosor del corte: 5 mm
 - espaciado: 2 mm
 - c. Tórax-abdomen:
 - grosor del corte: 10 mm
 - espaciado: 16 mm

- d. Cintura pelviana:
 - grosor del corte: 10 mm
 - espaciado: 12 mm
 - e. Muslo:
 - grosor del corte: 10 mm
 - espaciado: 16 mm
 - f. Pierna:
 - grosor del corte: 10 mm
 - espaciado: 19-20 mm
- Se han practicado secuencias estándar T1 y *STIR* con técnicas de *fast spin echo*. A continuación se detallan las características técnicas de ambas secuencias:
 - a. T1: TR/TE 240/11, matriz 448 x 269, 4 NEX.
 - b. *STIR*: TR/TE 2500/66, matriz 384 x 269, 2 NEX.
 - El tiempo total de adquisición aproximado por estudio ha sido de 25 minutos.
 - En pacientes claustrofóbicos los estudios se han practicado bajo sedación anestésica.

En algunos casos se ha empleado la tomografía axial computerizada para la obtención de imágenes musculares. Estos estudios se han realizado siguiendo el procedimiento estándar y se han obtenido imágenes axiales a nivel de pelvis, muslo y pierna.

Para gradar la afectación de los diversos grupos musculares⁴⁶ en las técnicas de imagen se ha empleado una escala semicuantitativa que se detalla a continuación:

- Grado M0: músculo con intensidad de señal normal (hipointensidad homogénea, en contraste con la hiperintensidad de la grasa subcutánea e intramuscular).
- Grado M1: hiperintensidad intramuscular parcheada pero no confluyente.
- Grado M2: hiperintensidad intramuscular parcheada confluyente, afectando <50% del volumen del músculo.
- Grado M3: hiperintensidad homogénea o parcheada confluyente afectando >50% del volumen del músculo.

2.8. PATOLOGÍA

Se ha procedido a la realización de biopsia muscular en algunos pacientes y a la reevaluación de las biopsias obtenidas previamente al inicio de este estudio.

La biopsia muscular se ha realizado a cielo abierto. El procedimiento empleado se detalla a continuación:

- Elección del músculo candidato a biopsiar. Para ello se ha tenido en cuenta el grado de afectación muscular mediante datos de la exploración clínica y en algunos casos, valorando los estudios de imagen muscular.
- Aplicación de anestesia local (Mepivacaína al 1%) en el punto de incisión, infiltrando la piel y el tejido celular subcutáneo hasta la fascia del músculo.
- Incisión quirúrgica cutánea de aproximadamente 4-5 cm de longitud, paralelamente a la orientación de los fascículos musculares y en diferente localización según el músculo diana.
- Incisión quirúrgica en la fascia muscular y en el epimisio.
- Separación de un fascículo muscular mediante disector y sección del mismo.

- Extracción de dos fragmentos musculares de aproximadamente 1 cm de longitud.
- Sutura de la fascia muscular con nylon de nº 2 y sutura cutánea con seda de nº 2.

Las muestras han sido evaluadas con diversos métodos:

a. Microscopía óptica

Para su evaluación mediante microscopía óptica, el tejido muscular se ha sumergido durante 10-12 segundos en isopentano, previamente enfriado en nitrógeno líquido. Pasado ese tiempo la muestra se ha extraído e introducido en un recipiente plástico con tapa ya enfriado directamente en nitrógeno líquido y se ha almacenado a -80°C.

Posteriormente se han realizado secciones de 6-8 µm mediante el criostato y se ha procedido con las tinciones histoquímicas convencionales: hematoxilina-eosina (HE), tinción PAS (periodic acid-Schiff), tricrómico modificado de Gomori, adenosin trifosfatasa (ATPasa) a pH de 4.3 y 9.4, succinato deshidrogenasa (SDH), citocromo C oxidasa (COX) y NADH-tetrazolium reductasa.

A su vez, se han realizado las tinciones inmunohistoquímicas de proteínas constituyentes del músculo, de forma manual y empleando anticuerpos monoclonales de ratón específicos para las siguientes proteínas: distrofina (NCL-Dys1, -Dys2, -Dys3), alfa y beta-sarcoglicanos (NCL-a-SARC y NCL-b-SARC), disferlina (NCL-Hamlet), caveolina (Caveolin 3, Santa Cruz Biotechnology INC), desmina (Chemicon internacional) y merosina (Laminin α2 Chain, Vector Lab).

b. Microscopía de fluorescencia

Se han empleado técnicas de inmunofluorescencia para analizar la distribución de las proteínas en el músculo.

Para ello, secciones de 8 μm del músculo biopsiado han sido trasferidas a portaobjetos de cristal, fijadas con metanol durante 5 minutos a -20°C y preservado a -80°C hasta su uso. Las secciones primero han sido bloqueadas con PBS (phosphate-buffered saline) que contiene seroalbúmina bovina al 1%. Con posterioridad han sido incubadas con el anticuerpo primario durante 120 minutos y después con el anticuerpo secundario Fitc-conjugado (Santa Cruz Biotechnology INC) durante 60 minutos⁵⁶.

Finalmente las secciones se han lavado varias veces en PBS, montado en Vectashield, examinado en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50 y fotografiado con una cámara Nikon (NIS-Elements Advanced Research).

A continuación se detallan los anticuerpos empleados:

- isoformas lenta y rápida de la cadena pesada de la miosina (Sigma y Chemicon International, respectivamente)
- desmina, $\alpha\beta$ -cristalina y ubiquitina (Chemicon internacional)
- miotilina (Santa Cruz Biotechnology INC)
- gelsolina, nebulina, titina y α -actinina (Sigma)

c. Western blot

La expresión de proteínas en la biopsia muscular se ha analizado mediante técnicas de Western blot⁵⁷.

La técnica de inmunotransferencia ha sido puesta a punto para cada proteína, utilizando para la electroforesis geles en gradiente, de 3-8% para proteínas de gran tamaño como la disferlina y distrofina, y de 4-12% para proteínas intermedias como la calpaína 3 (12A2 y 2C4), lamina A/C, emerina, y otras.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con poro de 0,45 μm (Invitrogen). Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína objeto de estudio durante dos horas, a

temperatura ambiente y en agitación. Tras someter las membranas a varios lavados, se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina (Sigma). A continuación, las membranas se revelaron con Sigma-Fast BCIP/NBT.

Como control de la carga proteica en las membranas de nitrocelulosa, se cuantificó la banda de miosina en el gel después de la transferencia.

d. Microscopía electrónica

Para el análisis ultraestructural las muestras de músculo han sido fijadas con una mezcla de paraformaldehído al 0.8% y glutaraldehído al 2% en un tampón de cacodilato sódico 0.1 M a pH de 7.4. Posteriormente, se han post-fijado en tetraóxido de osmio al 2% en el mismo tampón, deshidratado en una serie de acetonas a concentración creciente y se han incluido en una resina epóxica Epon.

A continuación, se han obtenido cortes semifinos de 90-100 nm mediante un ultramicrotomo Leica, los cuales se han montado en una rejilla de 200 mesh y teñido con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Finalmente, los cortes semifinos han sido examinados en un microscopio electrónico Philips CM 100 (FEI Company).

Mediante la aplicación de estas técnicas se ha procedido al análisis de los hallazgos patológicos en el músculo (variabilidad del tamaño de fibras musculares, agrupamiento de fibras por tipos, presencia de necrosis, regeneración, fenómenos de miofagia, infiltrados inflamatorios, atrofia muscular) y se ha valorado la presencia de anomalías específicas estructurales y ultraestructurales (depósitos, vacuolas simples o ribeteadas, cuerpos mielínicos, cuerpos hialinos, etc).

2.9. GENÉTICA

De todos los sujetos que han participado en este estudio se ha obtenido una muestra de sangre, a partir de la cual se ha extraído ADN mediante procedimientos estandarizados.

Previamente los participantes han firmado el consentimiento informado estándar para la realización de estudios genéticos, los cuales se han llevado a cabo en todos los individuos afectados, en miembros clínicamente indeterminados y en sujetos sanos de más de 35 años de edad.

Los estudios genéticos realizados se detallan a continuación:

a. Análisis mutacional

En primer término se ha procedido de forma secuencial al análisis mutacional de los genes candidatos que pueden verse implicados en la génesis de una miopatía con fenotipo distal anterior y patrón de herencia autosómico dominante. Entre ellos se incluye el gen de la titina (TTN) que produce la miopatía distal de Udd, el gen *MYH7* implicado en la miopatía distal de Laing y el gen de la desmina, que produce un tipo de miopatía miofibrilar. Otra entidad autosómico dominante y con fenotipo distal anterior es la miopatía distal por mutaciones en la VCP (*valosin containing protein*).

Sin embargo, otras miopatías que también afectan selectivamente la musculatura anterior de la pierna quedarían descartadas al presentar una herencia recesiva como la miopatía de Nonaka, producida por mutaciones en el gen *GNE*, y la miopatía distal por mutaciones en el gen de la nebulina.

El análisis mutacional se ha llevado a cabo como mínimo en un caso índice de cada una de las familias.

Los cebadores utilizados para amplificar los exones e intrones flanqueantes a secuenciar se han diseñado mediante el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha realizado usando 40 ng de ADN genómico en un volumen de 20 µl que contiene 1xPCR buffer, 5 nmol de cebador 3', 5 nmol de cebador 5', 200µM de cada dNTP y 0.4 U de Polimerasa de ADN Dynazyme II (Finnzymes).

La PCR se ha realizado en las siguientes condiciones:

- 10 minutos a 95°C
- 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos
- hibridación del cebador (*annealing*) a 58°C durante 30 segundos
- extensión, a 72°C durante 1 minuto
- extensión, a 72°C durante 10 minutos

La amplificación de los productos de la PCR se ha confirmado mediante electroforesis en un gel de agarosa antes de proceder a su secuenciación. A continuación, los productos de la PCR se han purificado usando el enzima Exonucleasa I y un tratamiento con fosfatasa alcalina (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). Posteriormente, se han secuenciado usando un kit de secuenciación (BigDye Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing Kit) y el analizador de ADN ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Finalmente, las secuencias se han analizado con el programa Sequencher v4.8.

Con posterioridad se ha procedido a la aplicación de técnicas de secuenciación en el resto de pacientes incluidos en el estudio.

b. Estudio de haplotipos

Para los estudios de haplotipos en relación al gen *MYH7* se han empleado 5 marcadores polimórficos en la región que comprende a dicho gen, en el

cromosoma 14: D14S50, D14S283, D14S990, D14S581 y D14S264. Concretamente, el gen *MYH7* se sitúa en el cromosoma 14, locus 14q12, entre la posición 22.951.789 y 22.974.690 pb.

La reacción de la PCR y la electroforesis en gel de agarosa se han realizado siguiendo procedimientos estandarizados.

El tamaño de los alelos se ha analizado con el programa GeneMapper v4.0. Debido a que entre los dos marcadores polimórficos que flanquean el gen *MYH7* existe una separación de 712.122 pb, para acotar más dicha región se han empleado los siguientes polimorfismos de nucleótido único (SNPs): rs2277474, rs743567, rs7157716, rs1951154, rs875908, rs8005199, rs1162360, rs10873105 y 15 nt *deletion*.

c. Estudios de ligamiento

En caso de no encontrar mutaciones en los genes candidatos se realizarán estudios de ligamiento. Para ello se incluirá ADN de individuos sanos y afectados de la misma familia, aplicando el método de *linkage*. Este método se utiliza para detectar la región cromosómica en la que se localiza el gen causante de la enfermedad.

La idea es averiguar si dos loci (uno correspondería a la enfermedad y el otro, a una determinada región genética) están ligados o no. La distancia entre dos loci puede medirse como fracción de recombinación, esto es, la frecuencia con que se produce una recombinación entre esos dos loci durante la meiosis.

La frecuencia de recombinación entre dos loci que están en distinto cromosoma o dentro de un mismo cromosoma pero se heredan independientemente es 0,5 mientras que cuando dos loci segregan siempre juntos la fracción de recombinación es 0. Las frecuencias de recombinación intermedias dan una idea

de los cercanos que están esos loci. A menor frecuencia de recombinación menor distancia entre ellos.

Cabe destacar que esta distancia está basada en la recombinación observada, es, por tanto, una distancia abstracta que no se corresponde con bandas cromosómicas o distancia en pares de bases. Para averiguar que significación estadística tiene el ligamiento de dos loci, a una determinada fracción de recombinación se calcula el valor LOD (Z). El valor Lod es un algoritmo que calcula la máxima verosimilitud de que dos loci estén ligados y da el resultado en forma logarítmica decimal. Arbitrariamente se considera que $Z= 3.0$ es el valor umbral para aceptar enlace, con un 5% de probabilidad de error. Con un valor de $Z= 3.0$, la probabilidad de que ese ligamiento sea debido al azar es de 1/1000. Valores de Z entre -2 y +3 no son concluyentes y valores de $Z <-2$ excluyen el enlace.

En la actualidad el análisis de *linkage* se lleva a cabo mediante programas informáticos como el paquete LINKAGE, GENEHUNTER y Merlin.

Además de la colaboración de la *Unidad de Genética* del Hospital Universitario La Fe, la mayor parte de los estudios genéticos se han desarrollado durante la estancia de la doctorando en Helsinki durante más de tres meses en el seno del *Folkhälsan Institute of Genetics*, bajo supervisión de los profesores Peter Hackman y Bjarne Udd. El profesor Bjarne Udd es líder del grupo de estudio de patología neuromuscular de este centro y coordinador del grupo de estudio de miopatías distales del *Centro Europeo de Enfermedades Neuromusculares* (ENMC).

E. RESULTADOS

Se han estudiado 10 familias, evaluándose un total de 92 sujetos, incluyendo 38 miembros afectados, 40 miembros sanos y 14 miembros clínicamente indeterminados. Previamente todos ellos han firmado el consentimiento informado de participación en este estudio, validado por el Comité Ético del Hospital La Fe. De forma adicional se ha procedido a la recogida de datos clínicos de 31 sujetos afectados fallecidos, pertenecientes a las 10 familias.

En una primera fase se ha procedido a la elaboración de los árboles genealógicos de las familias objeto del estudio (Anexo IV). A este respecto se ha descubierto que las cuatro primeras familias comparten un tronco común, con lo que realmente son ramas constituyentes de una gran familia, procedente de la comarca valenciana de *La Safor*. A una de dichas ramas pertenecían varios pacientes controlados en la consulta de la *Unidad de Patología Neuromuscular* del Hospital La Fe, los cuales habían sido diagnosticados de atrofia muscular espinal distal. Esta gran familia se describe como familia 1 (Anexo IV: Figura 1a y 1b).

Así mismo, las raíces de tres familias adicionales (familias 2, 3 y 4), genealógicamente no relacionadas con la familia 1, proceden de la misma región geográfica (Anexo IV: Figura 2). Por dicho motivo todas estas familias (familias 1, 2, 3 y 4) se han agrupado para su estudio, bajo el epígrafe miopatía de *La Safor*.

Adicionalmente, se ha procedido a la construcción de los pedigríes de las familias restantes (familias 5, 6 y 7), de procedencia geográfica variable y distinta de la comarca de *La Safor* (Anexo IV: Figura 3).

1. DATOS DEMOGRÁFICOS

1.1. Edad

La edad media de los individuos participantes en este estudio fue de 44 años (rango entre 12 y 78 años). Concretamente, fue de 43 años en los pacientes de las familias de *La Safor* y de 45 años en los pacientes de las familias 5, 6 y 7.

La edad de inicio de los síntomas osciló entre congénito y 50 años, con una edad media de inicio de 12.5 años. Desglosando por familias, la edad media de inicio en los pacientes procedentes de *La Safor* fue de 14 años (rango entre congénito y 50 años) y de 11 años en los pacientes de las familias restantes (rango entre 5 y 23 años).

La edad media a la que los pacientes consultaron por síntomas derivados de la miopatía fue de 38 años (rango entre 5 y 70 años) en las familias procedentes de *La Safor* y de 38.5 años en las familias 5, 6 y 7 (rango entre 10 y 60 años).

La edad media de fallecimiento en los pacientes procedentes de las familias de *La Safor* fue de 70 años (rango entre 36 y 93 años) y de 69 años en los pacientes de las familias 5, 6 y 7 (rango entre 55 y 90 años).

1.2. Género

La distribución de sexos en los pacientes fue de 20 mujeres y 12 hombres en las familias procedentes de *La Safor* y de cuatro mujeres y dos hombres en las familias 5, 6 y 7.

A su vez, en las familias de *La Safor* se ha estudiado un grupo de 37 miembros sanos compuesto por 20 mujeres y 17 hombres y un grupo de 14 miembros clínicamente indeterminados, formado por siete mujeres y siete hombres. En el resto de familias (5-7) se han estudiado tres miembros sanos (2 hombres y 1 mujer).

De forma adicional, se han recogido datos de pacientes fallecidos pertenecientes a las familias de *La Safor* (13 mujeres y 15 hombres) y de la familia 5 (1 mujer y 1 hombre).

2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

2.1. Estado clínico

En las familias procedentes de *La Safor* se han estudiado 32 individuos afectados, 14 individuos clínicamente indeterminados y 37 sujetos sanos.

En las familias 5, 6 y 7 se han estudiado 6 individuos afectados y 3 sujetos sanos.

2.2. Síntomas

Muchos pacientes relataban pequeños síntomas como por ejemplo una forma de andar peculiar, incapacidad de andar de talones o imposibilidad para usar chanclas, muchos años antes de consultar por debilidad manifiesta.

En relación a las familias de *La Safor*, el síntoma más frecuente de inicio fue la alteración de la marcha, descrita por 21 pacientes (65%) como una marcha patosa o peculiar. Otros síntomas frecuentes de inicio, aislados o combinados entre sí, fueron los tropiezos, las caídas, las deformidades en pies y la incapacidad para andar de talones.

Sin embargo, el motivo de consulta más frecuente, referido por aproximadamente la mitad de los pacientes, fue la debilidad en extremidades inferiores, expresada como dificultad para subir escaleras, incorporarse de la posición de cuclillas o “fallos” de las piernas, ocasionando caídas. Otros motivos habituales de consulta fueron la alteración de la deambulación (8 pacientes), mialgias (8 pacientes), tropiezos y caídas (6 pacientes), dolor lumbar (5 pacientes), calambres (3 pacientes) y deformidades en pies (3 pacientes), cansancio y fatiga muscular (2 pacientes).

Cabe destacar, que aproximadamente el 50% de los pacientes estudiados son casos secundarios, es decir, no habían consultado previamente a su participación en este estudio, aunque algunos de ellos relataban síntomas y algunas dificultades.

Respecto a las familias 5, 6 y 7 el síntoma más frecuente de inicio fue también la alteración de la marcha referido por 75% de los pacientes, seguido de caídas y tropiezos frecuentes. El síntoma de consulta más frecuente en los pacientes pertenecientes a dichas familias fue, así mismo, la alteración de la deambulación acompañada de otros síntomas como mialgias y fatiga con la actividad física, debilidad en extremidades inferiores y desarrollo de pie caído.

2.3. Exploración neurológica, fenotipo y curso clínico

La exploración neurológica se ha llevado a cabo en todos los individuos incluidos en este estudio, de forma protocolizada en la mayoría de ellos.

En las tablas 2a-2d se detallan datos relevantes de la exploración, fenotipo clínico y curso de la enfermedad en los pacientes pertenecientes a las familias objeto del estudio.

En la tabla 3 se recogen datos clínicos, reportados por los familiares, de miembros afectados fallecidos pertenecientes a las familias de *La Safor* y de la paciente 1.III-17.

Cabe mencionar, que las pacientes 1.III-17 y 1.IV-10 no pudieron ser reexploradas al permanecer la primera institucionalizada y al fallecer la segunda antes del inicio del estudio, pero se conoce que el curso de la enfermedad fue similar al de otros miembros afectados.

A su vez, el paciente 3.IV-1, antes de participar en el estudio, sufrió una amputación de las extremidades inferiores a nivel de la raíz del muslo debido a un accidente laboral quedando confinado en silla de ruedas, con lo que no se pudo evaluar la fuerza, reflejos miotáticos y sensibilidad en miembros inferiores, así como el patrón de la marcha, aunque previamente al accidente refirió debilidad en extremidades inferiores afectando a la musculatura proximal y distal.

Tabla 2a. Fenotipo clínico de los pacientes de la familia 1.

| Sujeto | 1.IV-12 | 1.IV-24 | 1.IV-26 | 1.V-12 | 1.V-27 | 1.V-31 | 1.VI-6 | 1.IV-34 | 1.IV-35 |
|--|--|-----------------------------------|------------------------------------|---------|------------------------------------|---------------------|-----------------|--|------------------------------------|
| Sexo/ Edad | M/ 62 | M/ 57 | M/ 53 | M/ 39 | V/ 33 | M/ 22 | V/ 12 | M/ 58 | V/ 54 |
| Edad inicio/ ECD | 8/ 30 | 24/ 45 | 30/ 53 | 10/ 39 | 0/ 5 | */ 22 | 5/ 12 | 50/ 58 | 50/ 54 |
| Debilidad inicial dorsiflexión punta del pie y tobillo | Sí | Sí | ? | Sí | Sí | EHL | Sí | ? | ? |
| Progresión de la debilidad | Pélvico-femoral, tronco y extensores dedos | Cinturas, tronco, codo, antebrazo | Pélvico-femoral y extensores dedos | - | Pélvico-femoral y extensores dedos | - | Pélvico-femoral | Pélvico-femoral, codo y extensores dedos | Pélvico-femoral y extensores dedos |
| Patrón clínico | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal | Distal-proximal | Distal (solo EHL) | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal |
| Debilidad facial/ PO | Sí / Sí | Sí / Sí | Sí / Sí | No / No | Sí / Sí | No / Sí | No / Sí | N.e | Sí / Sí |
| Dedo gordo caído | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí |
| Capacidad de andar de talones | No | No | No | No | No | Sí (con dificultad) | No | No | No |
| Deformidad | | | | | | | | | |
| - pie cavo | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | - | Sí | Sí | Sí |
| - RA | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | - | Sí | Sí | Sí |
| - escoliosis | - | Sí | Sí | - | Sí | Sí | - | - | Sí |
| - otros | - | Sí | Sí | - | Sí | Sí | Sí | - | - |
| Temblor | Sí | Sí | No | No | Sí | No | No | Sí | Sí |
| Marcha | | | | | | | | | |
| - estepaje | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | - | Sí | Sí | Sí |
| - hiperlordosis | Sí | Sí | Sí | - | - | - | - | - | Sí |
| - Trendelenburg | Sí | Sí | Sí | - | Sí | - | Sí | Sí | Sí |

| Sujeto | 1.IV-37 | 1.V-35 | 1.V-36 | 1.IV-48 | 1.V-47 | 1.V-48 | 1.IV-63 | 1.IV-69 | 1.V-63 |
|--|------------------------------------|---------|---------|------------------|---------------------|---------|-------------------------------------|------------------------------------|---------|
| Sexo/ Edad | M/ 47 | V/ 28 | V/ 22 | M/ 49 | M/ 25 | V/ 23 | M/ 70 | V/ 65 | V/ 39 |
| Edad inicio/ ECD | 40/ 47 | */ 28 | */ 22 | 15/ 49 | */ 25 | 5/ 23 | 5/ 70 | 5/ 50 | 5/ 39 |
| Debilidad inicial dorsiflexión punta del pie y tobillo | EHL | - | EHL | Sí | EHL | Sí | Sí | Sí | Sí |
| Progresión de la debilidad | Pélvico-femoral y extensores dedos | - | - | Extensores dedos | - | - | Cinturas, tronco y extensores dedos | Pélvico-femoral y extensores dedos | - |
| Patrón clínico | Distal-proximal | † | Distal | Distal | Distal (solo EHL) | Distal | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal |
| Debilidad facial/ PO | No / No | Sí / Sí | Sí / Sí | Sí / Sí | No / Sí | Sí / Sí | Sí / No | No / No | No / No |
| Dedo gordo caído | Sí | No | No | Sí | No | Sí | Sí | Sí | No |
| Capacidad de andar de talones | No | Sí | No | No | Sí (con dificultad) | No | No | No | No |
| Deformidad | | | | | | | | | |
| - pie cavo | - | Sí | Sí | - | - | Sí | - | - | - |
| - RA | Sí | - | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí |
| - escoliosis | - | Sí | - | - | Sí | Sí | Sí | - | - |
| - otros | - | - | - | Sí | Sí | - | - | - | - |
| Temblor | Sí | No | Sí | No | No | No | No | No | No |
| Marcha | | | | | | | | | |
| - estepaje | Sí | - | Sí | Sí | - | Sí | Sí | Sí | Sí |
| - hiperlordosis | - | - | - | - | - | - | Sí | - | - |
| - Trendelenburg | Sí | - | - | - | - | - | Sí | Sí | - |

Abreviaturas: ?, desconocido; ECD, edad de consulta o de diagnóstico; EHL, *extensor hallucis longus*; M, mujer; N.e, no evaluado; PO, paladar ojival; RA, retracción aquilea; V, varón. * Éste paciente no refiere ningún síntoma subjetivo. † Éste paciente está en un estadio presintomático.

Tabla 2b. Fenotipo clínico de los pacientes de las familias 2 y 3.

| Sujeto | 2.III-5 | 2.III-7 | 2.IV-5 | 3.IV-1 | 3.IV-2 | 3.IV-11 | 3.V-1 |
|---|--|--|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| Sexo/ Edad | M/ 56 | M/ 51 | V/ 21 | V/ 54 | M/ 51 | M/ 40 | M/ 24 |
| Edad inicio/ ECD | 5/ 50 | 5/ 40 | 3/ 20 | 5/ 50 | 49/50 | 5/ 40 | 2/6 |
| Debilidad inicial dorsiflexión de punta del pie y tobillo | Sí | Sí | Sí | Sí | ? | Sí | Sí |
| Progresión de la debilidad | Pélvico-femoral, tronco y extensores dedos | Pélvico-femoral, tronco y extensores dedos | Cintura escapular y extensores dedos | Pélvico-femoral y extensores dedos | Pélvico-femoral y extensores dedos | Pélvico-femoral y extensores dedos | Extensores dedos |
| Patrón clínico | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal |
| Debilidad facial/ PO | Sí / Sí | Sí / Sí | Sí / Sí | Sí / No | Sí / No | Sí / No | Sí / No |
| Dedo gordo caído | Sí | Sí | Sí | N.e | Sí | Sí | Sí |
| Capacidad de andar de talones | No | No | No | N.e | No | No | No |
| Deformidad | | | | | | | |
| - pie cavo | Sí | Sí | Sí | - | Sí | Sí | Sí |
| - RA | Sí | Sí | Sí | - | Sí | Sí | Sí |
| - escoliosis | - | - | Sí | Sí | - | - | Sí |
| - otros | Sí | Sí | Sí | - | Sí | - | - |
| Temblor | No | Sí | Sí | No | No | No | No |
| Marcha | | | | | | | |
| - estepaje | Sí | Sí | Sí | N.e | Sí | Sí | Sí |
| - hiperlordosis | Sí | Sí | Sí | N.e | - | Sí | - |
| - Trendelenburg | Sí | Sí | - | N.e | Sí | - | - |

Tabla 2c. Fenotipo clínico de los pacientes de la familia 4.

| Sujeto | 4.III-2 | 4.IV-2 | 4.IV-6 | 4.IV-7 | 4.V-2 |
|---|--|---|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Sexo/ Edad | M/ 78 | M/ 54 | M/ 46 | M/ 41 | V/ 30 |
| Edad inicio/ ECD | 5/ 64 | 5/ 40 | 5/ 32 | */ 41 | 2/ 30 |
| Debilidad inicial dorsiflexión de punta del pie y tobillo | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí |
| Progresión de la debilidad | Cinturas, tronco, codo y extensores de dedos | Pélvico-femoral, tronco y extensores de dedos | Pélvico-femoral y extensores de dedos | Extensores de dedos | Extensores de dedos |
| Patrón clínico | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal | Distal |
| Debilidad facial/ PO | Sí / No | Sí / No | Sí / No | Sí / No | No / No |
| Dedo gordo caído | Sí | Sí | Sí | Sí | No |
| Capacidad de andar de talones | No | No | No | No | No |
| Deformidad | | | | | |
| - pie cavo | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí |
| - RA | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí |
| - escoliosis | Sí | Sí | - | Sí | - |
| - otros | Sí | - | Sí | Sí | Sí |
| Temblor | Sí | No | Sí | No | Sí |
| Marcha | | | | | |
| - estepaje | Sí | Sí | Sí | Sí | - |
| - hiperlordosis | Sí | - | Sí | - | - |
| - Trendelenburg | Sí | Sí | Sí | - | - |

Abreviaturas: ?, desconocido; ECD, edad de consulta o de diagnóstico; EHL, *extensor hallucis longus*; M, mujer; N.e, no evaluado; PO, paladar ojival; RA, retracción aquilea; V, varón. * Éste paciente no refiere ningún síntoma subjetivo.

Tabla 2d. Fenotipo clínico de los pacientes de las familias 5-7.

| Sujeto | 5.III-1 | 6.IV-4 | 6.V-2 | 7.II-1 |
|---|---|--|-------------------------------|---------------------------------------|
| Sexo/ Edad | M/ 55 | M/ 39 | M/ 12 | M/ 78 |
| Edad inicio/ ECD | 23/ 40 | 5/ 39 | 5/ 10 | 5/ 60 |
| Debilidad inicial dorsiflexión de punta del pie y tobillo | Sí | Sí | Sí | Sí |
| Progresión de la debilidad | Cinturas, femoral y extensores de dedos | Pélvico-femoral, axial y extensores de dedos | Pélvica y extensores de dedos | Pélvico-femoral y extensores de dedos |
| Patrón clínico | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal | Distal-proximal |
| Debilidad facial/ PO | No / No | Sí / N.e | No / N.e | No / No |
| Dedo gordo caído | Sí | Sí | No | Sí |
| Capacidad de andar de talones | No | No | No | No |
| Deformidad | | | | |
| - pie cavo | Sí | Sí | Sí | N.e |
| - RA | Sí | Sí | Sí | Sí |
| - escoliosis | - | Sí | - | N.e |
| - otros | - | - | - | N.e |
| Temblor | No | No | No | Sí |
| Patrón de la marcha | | | | |
| - estepaje | Sí | Sí | Sí | Sí |
| - hiperlordosis | - | Sí | Sí | Sí |
| - Trendelenburg | Sí | Sí | - | Sí |

Abreviaturas: ECD, edad de consulta o de diagnóstico; EHL, *extensor hallucis longus*; M, mujer; N.e, no evaluado; PO, paladar ojival; RA, retracción aquilea; V, varón.

Mediante anamnesis se valoró la localización inicial de la debilidad, la cual afectó a la musculatura del compartimiento anterior de la pierna en 83% de los pacientes de *La Safor* y en el 100% de los pacientes pertenecientes a las otras familias. En 17% de los pacientes de *La Safor* la afectación inicial no pudo deducirse mediante anamnesis, considerándose como desconocida. No obstante, en la exploración, se objetivó debilidad en la musculatura del compartimiento anterior de la pierna en todos los pacientes. Cabe remarcar que en dos sujetos jóvenes, que no referían síntomas, la debilidad estaba restringida al músculo EHL.

La tabla 4 recoge la valoración de la debilidad muscular por grupos, según la escala *MRC*. En algunos pacientes se observó cierta asimetría derecha-izquierda en el grado de debilidad muscular.

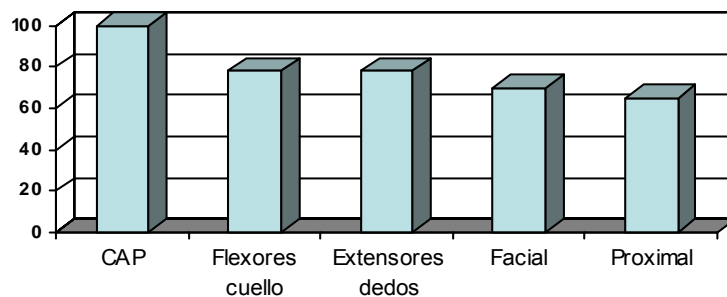
Tabla 3. Rasgos fenotípicos, curso y discapacidad de los pacientes fallecidos procedentes de las familias objeto del estudio y de la paciente 1.III-17, reportados por sus familiares.

| Sujeto | Sexo | Síntoma reportado | Discapacidad | Edad/ Causa de la muerte | Cardiopatía | Otros |
|----------|------|------------------------------------|--|---------------------------------|----------------|----------------------|
| 1.II-1 | M | Alteración de la marcha | Caminó con bastón | 80/ ? | No | Diabetes |
| 1.II-3 | V | Estepaje | Silla de ruedas > 75 años | 84/ Ictus | No | - |
| 1.II-5 | M | Alteración de la marcha y mialgias | Caminó con bastón | 85/ Enfermedad gastrointestinal | No | - |
| 1.II-7 | M | Alteración de la marcha | Marcha autónoma | 48/ Cáncer de mama | No | - |
| 1.III-5 | M | Estepaje | Marcha autónoma | 78/ IMA | Isquémica | - |
| 1.III-17 | M | Pie cavo y estepaje | Silla de ruedas > 80 años | -/ - | No | Fractura de cadera |
| 1.III-18 | V | Estepaje | Marcha autónoma | 38/ Ictus | ? | - |
| 1.III-21 | V | Alteración de la marcha | Caminó con bastón | 48/ Cáncer de laringe | No | - |
| 1.III-22 | V | Estepaje | Caminó con bastón | 74/ ? | No | - |
| 1.III-27 | V | Estepaje | Caminó con bastón | 80/ Cáncer de pulmón | Isquémica | - |
| 1.III-29 | V | Estepaje y debilidad en MMII | Confinado en silla de ruedas | 71/ ICC | Isquémica + MP | - |
| 1.III-38 | F | Alteración de la marcha y mialgias | Silla de ruedas > 90 años | 93/ Ictus | No | - |
| 1.IV-10 | F | Estepaje y debilidad en MMII | Caminó con bastón | 66/ Cáncer de colon | No | - |
| 1.IV-31 | V | Estepaje | Marcha autónoma | 45/ Cáncer de pulmón | No | - |
| 2.II-4 | V | Pie caído y estepaje | Marcha autónoma | 36/ Cáncer de esófago | No | - |
| 3.I-2 | M | Alteración de la marcha | Marcha autónoma | 65/ ? | ? | - |
| 3.II-1 | M | Pie cavo y estepaje | Marcha autónoma | 45/ Politraumatismo | No | - |
| 3.II-3 | M | Pie cavo y estepaje | Confinado en silla de ruedas | 70/ ? | No | Diabetes |
| 3.II-6 | M | Alteración de la marcha | Caminó con bastón | 82/ Cáncer de hígado | No | - |
| 3.II-7 | V | Alteración de la marcha | Usó andador | 75/ ? | No | - |
| 3.II-11 | M | Estepaje | Marcha autónoma | 78/ Cáncer gástrico | No | - |
| 3.II-13 | M | Alteración de la marcha | Caminó con bastón > 60 años | 77/ Cáncer gástrico | No | - |
| 3.III-2 | V | Estepaje, pie cavo y lumbalgia | Caminó con bastón > 70 años | 76/ Ictus | No | Hemiparesia residual |
| 3.III-7 | V | Estepaje | Marcha autónoma | 52/ Tumor cerebral | No | - |
| 3.III-10 | M | Estepaje | Marcha autónoma | 53/ Cáncer de mama | No | - |
| 4.I-1 | V | Alteración de la marcha | Marcha autónoma | 80/ ? | No | - |
| 4.II-1 | M | Estepaje y deformidad en pies | Usó andador > 80 años | 83/ ICC | Isquémica | Obesidad |
| 4.II-5 | V | Estepaje y debilidad en MMII | Silla de ruedas > 80 años | 83/ ? | ? | - |
| 4.III-1 | V | Alteración de la marcha | Marcha autónoma | 65/ Cancer | No | - |
| 4.III-9 | V | Alteración de la marcha | Silla de ruedas por accidente de tráfico | 80/ Ictus | ? | - |
| 5.I-1 | V | Alteración de la marcha | Silla de ruedas > 80 años | 90/ ? | ? | - |
| 5.II-2 | M | Alteración de la marcha | Caminó con bastón > 60 años | 76/ ? | No | - |

Abreviaturas: ?, desconocido; IMA, infarto de miocardio agudo; ICC, insuficiencia cardíaca congestiva; M, mujer ; MMII, miembros inferiores; MP, marcapasos cardíaco; V, varón.

El patrón de distribución de la afectación muscular se representa en la figura 4. En todos los pacientes sintomáticos se constató debilidad en la musculatura del compartimento anterior de la pierna, siendo dicho compartimento el más gravemente afecto en todos los casos. La debilidad involucró de forma adicional a la musculatura flexora del cuello en 78% de los pacientes de *La Safor*, extensora de dedos (78%) y proximal de extremidades (65%), principalmente inferiores. A su vez, en un 70% de los pacientes se constató debilidad facial, en todos los casos en grado leve.

Figura 4. Patrón de debilidad muscular en los pacientes de las familias de *La Safor*.



El patrón de afectación muscular en los pacientes pertenecientes a las familias 5, 6 y 7 fue superponible al de los pacientes de las familias de *La Safor*.

Analizando la distribución de la debilidad muscular en relación a la edad, sólo en un tercio de los pacientes de *La Safor* por debajo de la quinta década, la debilidad estaba restringida al compartimento anterior de la pierna. Los dos tercios restantes asociaban debilidad en musculatura facial, flexora de cuello y extensora de dedos y adicionalmente, en 25% de ellos, se objetivó debilidad de musculatura de cinturas.

Tabla 4. Valoración del balance motor (escala MRC) en los pacientes estudiados.

| Sujeto | Cuello | | Hombro | | Codo | | Muñeca | | Dedos | | Cadera | | Rodilla | | Tobillo | | Punta | |
|---------|--------|---|--------|----|------|---|--------|---|-------|----------------|--------|-----|---------|-----|---------|-----|-------|------|
| | F | E | Ab | Ad | F | E | F | E | F | E ^a | F | E | F | E | F | E | F | EHL |
| 1.IV-12 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 3; 4 | 4 | 4 | 4+ | 4- | 4 | 1 | 4 | 0 |
| 1.IV-24 | 3 | 5 | 4 | 4 | 4 | 3 | 5 | 4 | 4 | 3; 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 4 | 0 | 4 | 0 |
| 1.IV-26 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 1 | 4 | 0 |
| 1.V-12 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 1 |
| 1.V-27 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5- | 5 | 5 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 |
| 1.V-31 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4-4 |
| 1.VI-6 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 2 |
| 1.IV-34 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 2 | 5 | 0 |
| 1.IV-35 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4+ | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 0 |
| 1.IV-37 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4/3 | 4 | 4 | 5 | 4/3 | 5 | 1 |
| 1.V-31 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4-4 |
| 1.V-35 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 1.V-36 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4/3 |
| 1.IV-48 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 5 | 0 |
| 1.V-47 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 |
| 1.V-48 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 5 | 1 |
| 1.IV-63 | 4 | 5 | 4-5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 3 | 5 | 0 |
| 1.IV-69 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3; 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 5 | 0 |
| 1.V-63 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4-3 |
| 2.III-5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 4 | 0 |
| 2.III-7 | 3 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 3; 4 | 4- | 4- | 4 | 4- | 4 | 1 | 4 | 0 |
| 2.IV-5 | 4 | 5 | 5/4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3; 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0/2 | 5 | 0/1 |
| 3.IV-1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4-4 | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e |
| 3.IV-2 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5/4 | 5 | 5 | 5/4 | 4 | 2 | 4 | 0 |
| 3.IV-11 | 3+ | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4+ | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2-3 | 5 | 2/1 |
| 3.V-1 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3; 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1/2 | 4 | 0 |
| 4.III-2 | 4 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4- | 4- | 4- | 4- | 4 | 5 | 2 | 5 | 0 |
| 4.IV-2 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4- | 4- | 4 | 5 | 5 | 3- | 5 | 0 |
| 4.IV-6 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4+ | 4/5 | 5 | 2 | 5 | 0 |
| 4.IV-7 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 5 | 1 |
| 4.V-2 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4/5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4+ | 5 | 4/4- |
| 5.III-1 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1/2 | 4 | 0 |
| 6.IV-4 | 4- | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2/3 | 4- | 4- | 4+ | 4 | 4 | 2/3 | 4 | 0 |
| 6.V-2 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4+ | 5 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 2 |
| 7.II-1 | 4- | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4- | 4- | 4 | 5 | 4 | 5 | 1/2 | 5 | 0 |

Se han observado algunas asimetrías (Derecha/Izquierda). ^a dedo índice; 3º-5º dedos.
 Abreviaturas: Abd, abducción; Ad, aducción; E, extensión; EHL, *extensor hallucis longus*; F, flexión; N.e, no evaluado.

Respecto a la implicación de la musculatura de la cintura escapular, se encontró debilidad a dicho nivel junto con la presencia de escápulas aladas en tres pacientes con edades superiores a los 50 años y en el paciente 2.IV-5 a los 22 años. Este paciente, que a los 12 años comenzó a aquejar debilidad para elevar el miembro superior izquierdo, asociaba un hábito marfanoide, incluyendo deformidad asimétrica de la parrilla costal.

En relación a los pacientes pertenecientes a las familias 5, 6 y 7, a la afectación de la musculatura del compartimento anterior de la pierna, se sumó debilidad de grupos musculares proximales de predominio en extremidades inferiores en todos los casos y de musculatura extensora de dedos de la mano en 75%.

Respecto a la disminución del volumen muscular o atrofia, fue visible en el compartimento anterior de la pierna en 77% de los pacientes de *La Safor* (Figura 5A). Adicionalmente, 20% de los enfermos asoció atrofia de la musculatura pélvico-femoral. En algunos casos, la valoración de la atrofia muscular no fue posible por el grosor del panículo adiposo. En contraposición, algunos pacientes presentaban hipertrofia muscular de otros grupos, fundamentalmente del compartimento posterior de la pierna (20%) (Figura 5C). En relación a los pacientes pertenecientes a las restantes familias, se objetivó atrofia del compartimento anterior de la pierna y también de la musculatura pélvico-femoral en 75% de los casos y únicamente en un enfermo se constató la presencia de hipertrofia muscular, a nivel de las pantorrillas.

Al analizar el fenotipo clínico de los pacientes de *La Safor*, se constató una considerable variabilidad que osciló desde individuos asintomáticos con signos clínicos en la exploración (12%), pasando por individuos con afectación selectiva distal (25%) hasta pacientes con fenotipo distal-proximal (60%).

En lo que respecta a los pacientes pertenecientes a las otras familias, en el momento en que fueron valorados, todos ellos manifestaron un fenotipo distal-proximal.

En cuanto a otros signos característicos observados en los pacientes de *La Safor*, destacó la incapacidad de andar de talones, presente en 90% de ellos y el signo del dedo gordo caído, en 70% de los casos (Figura 5A y B). En las otras familias estudiadas, el 100% de los pacientes fueron incapaces de andar de talones y 75% de los mismos presentó el signo del dedo gordo caído.

La presencia de deformidades, fundamentalmente afectando los pies se constató frecuentemente en la exploración clínica. Concretamente, el 84% de los pacientes de *La Safor* presentó retracción aquilea, 72% asoció deformidades en pies como dedos en martillo o alteración del arco plantar habitualmente en forma de pies cavos y 47% presentó escoliosis. Asimismo, se objetivó la presencia de paladar ojival, no acompañado de otros rasgos dismórficos faciales, en más de la mitad de los pacientes de *La Safor* (Figura 5G). En relación a los enfermos procedentes de las familias 5-7, en todos ellos se detectó retracción del tendón de Aquiles asociada a pie cavo en 75% de los mismos.

Respecto a los reflejos miotáticos, fueron normales en 21% de los pacientes de *La Safor*, hipoactivos en extremidades inferiores en 14% de los pacientes y ausentes a nivel aquileo y rotuliano en 65% y 34% de los pacientes respectivamente. En los pacientes pertenecientes a las familias 5-7, los reflejos miotáticos en extremidades inferiores fueron hipoactivos en 50% de ellos, estaban abolidos en un 25% y fueron normales en el 25% restante.

La exploración de la sensibilidad fue normal en 82% de los pacientes de *La Safor* y en 75% de los pacientes pertenecientes a las otras familias. En el resto de los pacientes, con edades comprendidas entre 54 y 78 años, se constató una hipopalestesia en pies.

El patrón de la marcha más frecuente fue la marcha en estepaje observada en 75% de los pacientes de *La Safor* y en la totalidad de los pacientes pertenecientes a las familias 5-7, al cual se añadió basculación pélvica en 53% y 75% de los casos e hiperlordosis lumbar en 31% y 50%, respectivamente.

Figura 5. Rasgos clínicos de los pacientes de las familias de *La Safor*.



La foto A) muestra la atrofia característica de la musculatura tibial anterior junto con la presencia de pie caído bilateral y el signo del dedo gordo caído. En B) se objetiva la imposibilidad para ponerse de talones; nótese la tendencia a extender la punta del pie mediante el empleo de la musculatura extensora común de los dedos de forma compensatoria. La hipertrofia de gemelos se ejemplifica en C). En D) se muestra la debilidad asimétrica de la musculatura extensora de dedos y muñeca. E) denota el uso de la maniobra de Gowes para incorporarse del suelo en un paciente joven. La presencia de escápulas aladas se muestra en F). G) ejemplifica la presencia de paladar ojival.

A continuación se relatan algunos casos clínicos de pacientes pertenecientes a las familias de *La Safor*, que ejemplifican la variabilidad fenotípica que hemos observado en estos pacientes:

Paciente 1.IV-24

Esta paciente consultó a los 24 años de edad por vértigos, y en la exploración neurológica se detectó la presencia de un pie caído bilateral. En dicho momento se realizó un estudio electrofisiológico que fue interpretado como neuropático.

A la edad de 45 años consultó por debilidad en extremidades inferiores que condicionaba dificultad para subir escaleras, incorporarse de sillas bajas o de la posición de cuclillas. En la exploración se objetivó la existencia de una atrofia grave de la musculatura del compartimento anterior de la pierna y ligera a nivel de *tríceps braquial* y muslos, junto con graves deformidades en los pies. A su vez, se constató una paresia completa de la musculatura extensora de tobillo y punta, junto con debilidad de tríceps y musculatura de cintura escapular y pelviana.

Esta paciente fue reexaminada a los 57 años de edad, detectándose una progresión de la atrofia muscular a nivel de la musculatura del muslo y pelviana, y la existencia de escápulas aladas, de predominio en el lado derecho. Adicionalmente se constató debilidad de musculatura de tronco y de extremidades superiores, tanto a nivel proximal como distal. Característicamente, la debilidad para la extensión de dedos era más manifiesta en 3º-5º dedos (*MRC 2/5*), estando más preservada la extensión del dedo índice (*3/5*). Presentaba el signo del dedo gordo caído y pie caído bilateral. Los reflejos de estiramiento muscular eran hipoactivos a nivel rotuliano y estaban abolidos a nivel aquileo. La sensibilidad vibratoria estaba ligeramente disminuida en miembros inferiores. Se objetivó un temblor fino postural y de acción en ambas manos. La paciente presentaba limitación de la deambulaci3n precisando de un andador y para salir de su domicilio empleaba una silla de ruedas.

Paciente 1.V-27

Este sujeto es el hijo de la paciente anterior. Cuando nació presentó deformidades en pie y empleó ortesis hasta los 6 meses de edad. Pese a ello alcanzó los ítems del desarrollo en tiempos normales. En la infancia desarrolló una marcha en estepaje y fue incapaz de practicar actividades deportivas.

En la tercera década el paciente desarrolló debilidad en musculatura proximal de extremidades inferiores y comenzó a notar cansancio en los brazos al cargar objetos pesados. Fue examinado a los 24 años de edad, constatándose un desarrollo muscular escaso y marcada debilidad y atrofia de la musculatura del compartimento anterior de la pierna. Asociaba debilidad leve a nivel de glúteos y cuádriceps (4+/5), con normalidad en el resto de grupos.

Fue reexaminado a los 33 años de edad en el seno de este estudio, evidenciándose progresión leve de la debilidad de glúteos y cuádriceps (4/5), junto con debilidad adicional en músculos flexores de cuello (3/5) y extensores de dedos (4/5). Así mismo, se constató el signo del dedo gordo caído y pie caído bilateral. Presentaba una marcha en Trendelenburg y se incorporaba del suelo con la maniobra de Gowers. Los reflejos de estiramiento muscular eran hipoactivos de forma global y estaban abolidos a nivel aquileo. La exploración de la sensibilidad fue normal. Presentaba un temblor fino postural y de acción en manos.

Paciente 2.IV-5

Este paciente presentó en su primera infancia una tendencia a andar de puntillas seguido del desarrollo de un pie caído bilateral. Por ello utilizó férulas de antiequino. A los 12 años de edad aquejó debilidad en el miembro superior izquierdo.

Al explorarlo a los 20 años se objetivó la existencia de escápulas aladas, predominantemente en el lado izquierdo junto con un hábito marfanoide, incluyendo deformidades de la pared costal. La debilidad estaba restringida a nivel facial, musculatura periescapular izquierda, compartimento anterior de la pierna y

extensores de dedos. Presentaba el signo del dedo gordo caído y pie caído bilateral. Pese a estas alteraciones el paciente era capaz de practicar algunos deportes.

Paciente 3.IV-2

Este paciente no refirió ningún síntoma hasta finales de la quinta década, momento en que comenzó a notar dificultad para incorporarse de la silla y subir escaleras. Asociaba artromialgias generalizadas y había sido diagnosticada de fibromialgia.

Al explorarla a los 51 años de edad, el grosor del panículo adiposo impidió la valoración de la posible atrofia muscular. Presentaba debilidad facial leve junto con ptosis palpebral bilateral, debilidad en músculos flexores de cuello y extensores de dedos. La evaluación de los grupos musculares de extremidades inferiores se vio interferida por el desencadenamiento de dolor, apreciándose paresia completa del músculo *extensor hallucis longus* (0/5) y debilidad marcada en la extensión del tobillo (2/5), junto con debilidad leve (4/5) en musculatura flexo-extensora de cadera, glúteo y cuádriceps. Los reflejos de estiramiento muscular estaban abolidos en extremidades inferiores. Presentaba el signo del dedo gordo caído y pie caído bilateral. Asociaba deformidades en pies en forma de pies cavos, retracción aquilea y dedos en garra. Se levantaba del suelo con la maniobra de Gowers. Presentaba una marcha con leve basculación pélvica y un ostensible estepaje.

Paciente 4.IV-7

Esta paciente, subjetivamente asintomática, fue valorada a los 41 años en el seno del estudio familiar. Como únicos datos de interés refería que desde la infancia era incapaz de ponerse de talones y había sido intervenida de *hallux valgus* bilateral. En la exploración física destacaba la delgadez y un pobre desarrollo muscular de forma global junto con atrofia de la musculatura del compartimento anterior de la pierna. Las escápulas sobresalían sin que existiera debilidad en la musculatura de dicha localización. Se objetivó debilidad restringida a musculatura facial en grado leve,

flexora de cuello, músculos extensores de dedos (4/5), extensión de tobillo (2/5) y *extensor hallucis longus* (1/5). Presentaba el signo del dedo gordo caído, pie caído bilateral y caminaba con un leve estepaje. Los reflejos de estiramiento muscular estaban abolidos a nivel aquileo. La exploración de la sensibilidad fue normal.

2.4. Discapacidad funcional

En cuanto a la discapacidad funcional en los pacientes de *La Safor* osciló desde individuos asintomáticos sin ninguna repercusión funcional hasta sujetos confinados en silla de ruedas. En los pacientes de las familias 5, 6 y 7 la discapacidad funcional fluctuó entre una alteración de la deambulación moderada con dificultad para la práctica deportiva en el paciente más joven, pasando por una marcha autónoma dificultosa, hasta el uso de bastones para deambular en el paciente más anciano.

En la tabla 5 se especifica el grado de discapacidad de los pacientes pertenecientes a las familias de *La Safor*, valorado evolutivamente. El 84% de los pacientes mantuvo un grado de discapacidad por debajo de 4 puntos, es decir, deambulaban autónomamente sin precisar del uso de dispositivos de ayuda para la deambulación, aunque cabe remarcar que la marcha era dificultosa en 29% de ellos.

Asimismo, en las columnas de la derecha de la tabla 5 se refleja el grado de discapacidad de los enfermos de *La Safor* fallecidos, recogido a través de la historia clínica o a partir de la información aportada por sus familiares. Es remarcable que más de la mitad de los mismos requirió el uso de algún dispositivo de ayuda para la deambulación, mayoritariamente a edades avanzadas.

Finalmente, cabe destacar que factores secundarios a la miopatía como la patología articular y las fracturas derivadas de las frecuentes caídas que presentaban estos pacientes, jugaron un papel importante en la discapacidad. A su vez, las mialgias en relación o no con la actividad física condicionaron discapacidad en algunos pacientes.

Tabla 5. Discapacidad de los pacientes de La Safor.

| Grado de discapacidad de los pacientes evaluados | n | % | Grado de discapacidad de los pacientes fallecidos | n | % |
|--|---|-------|---|---|-------|
| 0 | 6 | 19.35 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 6 | 19.35 | 1 | 4 | 14.3 |
| 2 | 5 | 16.1 | 2 | 2 | 7.1 |
| 3 | 9 | 29 | 3 | 5 | 17.85 |
| 4 | 1 | 3.2 | 4 | 8 | 28.6 |
| 5 | 0 | 0 | 5 | 1 | 3.6 |
| 6 | 1 | 3.2 | 6 | 2 | 7.1 |
| 7 | 3 | 9.7 | 7 | 6 | 21.4 |
| 8 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 |

3. DATOS DE LABORATORIO

Se ha determinado los niveles de CK sérica en 28 pacientes y en cinco individuos clínicamente indeterminados pertenecientes a las familias objeto del estudio. Todos ellos presentaron niveles de CK comprendidos en el rango de normalidad excepto dos pacientes (1.IV-37, 1.V-27), los cuales presentaron elevación de CK en una determinación aislada en rango moderado (257-400 UI/L).

4. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDIACA

La posible afectación cardíaca en los pacientes y en individuos clínicamente indeterminados de las familias objeto del estudio se ha valorado en todos los casos a través de la evaluación clínica y mediante la realización de ECG en 29 de ellos.

La evaluación cardíaca se ha completado con estudio ecocardiográfico en 20 sujetos. Excepcionalmente y bajo indicación de su Cardiólogo algunos pacientes se han sometido a una prueba de esfuerzo (paciente 3.IV-2) y/o a una coronariografía (pacientes 3.IV-1 y 3.IV-2).

Se han detectado anomalías en los estudios cardíacos en cinco pacientes de las familias de *La Safor* y en un familiar sano, las cuales se relatan a continuación. En el ECG realizado a la paciente 1.IV-48 se detectó un síndrome de Wolff-Parkinson-White asintomático, proponiéndose ablación de la vía accesoria por radiofrecuencia.

En el estudio ecocardiográfico de las pacientes 1.IV-12 y 1.IV-63 se objetivó una alteración del patrón de llenado diastólico compatible con una alteración de la relajación del ventrículo izquierdo, sin hipertrofia ventricular izquierda ni otras anomalías asociadas. Ambas pacientes padecían de HTA en tratamiento farmacológico.

Es destacable que el paciente 3.IV-1, controlado desde los 38 años por Cardiología por padecer una HTA juvenil, desarrolló una miocardiopatía dilatada a los 46 años de edad, previamente a la participación en este estudio, con disfunción cardíaca progresiva. A los 50 años de edad su clase funcional según la escala de la *NYHA* era de II-III y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo era del 25%. Un cateterismo coronario descartó la existencia de lesiones en el árbol coronario. En su seguimiento se detectó un flutter auricular paroxístico y un bloqueo completo de rama izquierda del Haz de His. Por dicho motivo, se le implantó un desfibrilador y resincronizador biventricular a los 51 años de edad.

Su hermana, la paciente 3.IV-2, a los 50 años de edad presentó un episodio de dolor torácico, motivo por el cual se le realizó un ECG, cuyas alteraciones se interpretaron como signos de isquemia subepicárdica antero-septal. Por ello fue sometida a una ecocardiografía que no objetivó anomalías y posteriormente a una coronariografía, que descartó estenosis significativas en el árbol coronario.

Su hermano, 3.IV-6, no afecto de la miopatía, presentó a su vez alteraciones transitorias en un ECG rutinario, motivo por el cual se sometió de forma secuencial a una ergometría, ecocardiografía y coronariografía, sin encontrarse alteraciones relevantes. Los tres miembros mencionados de esta familia padecían HTA de inicio juvenil y difícil control pese al empleo de politerapia antihipertensiva.

En relación a los pacientes fallecidos pertenecientes a las familias de *La Safor*, existe constancia de que cinco sujetos fueron diagnosticados de cardiopatía isquémica y adicionalmente uno de ellos precisó de la implantación de marcapasos cardíaco por desarrollar un trastorno del ritmo cardíaco.

5. EVALUACIÓN DEL APARATO RESPIRATORIO

La valoración de la función respiratoria en los pacientes y en individuos clínicamente indeterminados pertenecientes a las familias objeto del estudio, se ha llevado a cabo a través de la evaluación clínica en todos ellos, no encontrándose alteraciones en ninguno.

No obstante, se realizaron pruebas funcionales respiratorias en dos de los pacientes con más años de evolución de la miopatía (1.IV-12 y 1.IV-24), ambos pertenecientes a la familia 1, resultando alteradas en uno de ellos. La paciente 1.IV-24, con 54 años de edad es el caso más grave de la serie. En dicha paciente se objetivó un descenso de la PIM (45% del valor teórico) y una disminución de la PO.1 (20% del valor teórico), sin repercusión clínica.

6. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

La evaluación neurofisiológica se ha practicado en 15 pacientes y en dos sujetos clínicamente indeterminados (1.V-28 y 1.V-31) de las familias procedentes de *La Safor*. En la tabla 6 se detallan los resultados de los estudios neurofisiológicos de estos pacientes.

En el estudio EMG, doce pacientes mostraron cambios miopáticos, consistentes en potenciales de unidad motora (PUMs) polifásicos de baja amplitud y corta duración, con patrón de reclutamiento precoz, a nivel de la musculatura proximal y distal de extremidades. De forma adicional, en cinco de ellos se encontraron algunos rasgos

considerados neurógenos, como PUMs de amplitud incrementada y aumento de la densidad de fibras en el EMG de fibra aislada. En un paciente (1.IV-26) el patrón se consideró mixto al objetivarse signos miopáticos y neurógenos en la misma proporción. En dos pacientes el patrón electromiográfico se consideró neurógeno debido al hallazgo de PUMs polifásicos de gran amplitud y duración y al incremento de la densidad de fibras en el EMG de fibra aislada.

Asimismo, en nueve pacientes se encontró actividad espontánea en reposo, siendo prominente en tres de ellos.

Respecto a los estudios de conducción nerviosa, las velocidades de conducción fueron normales en todos los casos excepto en la paciente 1.III-17, en la cual dos estudios seriados mostraron la ausencia del potencial evocado sensitivo del nervio sural bilateralmente. Asimismo, se constató una disminución de la amplitud del potencial motor del nervio peroneal debido a la atrofia muscular en cinco pacientes.

En cuanto a los estudios neurofisiológicos llevados a cabo en dos sujetos clínicamente indeterminados, quienes referían mialgias y molestias lumbares respectivamente, mostraron alteraciones en uno de ellos (1.V-31), que fueron interpretadas como secundarias a una radiculopatía lumbar. Al llevar a cabo los estudios genéticos se comprobó que este sujeto padecía la miopatía.

Por otro lado, se realizaron estudios neurofisiológicos en tres pacientes pertenecientes a las familias 5, 6 y 7, en uno de ellos de forma seriada. El patrón fue miopático en todos los casos, con PUMs polifásicos de amplitud y duración disminuida y tendencia a la interferencia precoz. Solamente en un paciente se objetivó actividad espontánea en forma de ondas positivas en cuádriceps. Las velocidades de conducción nerviosa estuvieron dentro del rango de normalidad en todos ellos.

Tabla 6. Hallazgos neurofisiológicos en pacientes de las familias procedentes de La Safor.

| Sujeto | 1.III-17 | 1.IV-10 | 1.IV-12 | 1.IV-24 | 1.IV-26 | 1.IV-35 | 1.IV-37 | 1.IV-69 |
|---|----------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| Edad del estudio (años) | 54 61 | 38 | 30 54 | 24 36 | 46 | 54 | 47 | 63 |
| CNS | PNS de sural ausente | Nr | Nr | Nr | Nr | Nr | Nr | Nr |
| CNM | DAP | Nr | Nr | DAP | Nr | Nr | Nr | DAP |
| Actividad espontánea | - | - | - | - + | + | - | +++ | + |
| PUM - amplitud - duración - polifasia - reducción reclutamiento | Nr, D Nr Sí Grave | D D Sí Mod | D* D Sí Mod-grave | Nr D N.e D - Sí Grave | I D, I (EDB) Sí Mod-grave | D D Sí Mod | D* D Sí Grave | D* D Sí Grave |
| EMG fibra aislada | N.e | N.e | I d.f (TA) | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e |
| Conclusión | Np | Mp | Mp | Np Mp | Np-mp | Mp | Mp | Mp |

| Sujeto | 1.V-12 | 1.V-27 | 1.V-31 | 2.III-7 | 3.V-1 | 4.III-2 | 4.IV-2 | 4.IV-6 |
|---|---------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| Edad del estudio (años) | 31 | 11 32 | 15 | 44 | 6 8 | 64 | 40 53 | 32 41 |
| CNS | Nr | Nr | Nr | Nr | Nr | Nr | Nr | Nr |
| CNM | Nr | Nr | Nr | Nr | Nr | DAP | DAP | Nr |
| Actividad espontánea | - | + | + | + | - ++ | - | - | ++ - |
| PUM - amplitud - duración - polifasia - reducción reclutamiento | I I Sí Mod | D D Sí Mod | I (EDB) I (EDB) Sí Mod | D D Sí Grave | D D Sí Mod | D D Sí Mod-grave | D* D Sí Mod | D D Sí Mod-grave |
| EMG fibra aislada | I d.f (TA) | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | I d.f (EDC) |
| Conclusión | Np | Mp | Np | Mp | Mp | Mp | Mp | Mp |

Abreviaturas: CNM, conducción nerviosa motora; CNS, conducción nerviosa sensitiva; EDB, *extensor digitorum brevis*; EDC, *extensor digitorum communis*; D, disminuido; DAP, disminución de la amplitud del potencial motor de nervio peroneal; d.f, densidad de fibras; I, incrementado; Mod, moderada; Mp, miopático; N.e, no evaluado; Np, neuropático; Nr, normal; PNS, potencial nervioso sensitivo; TA, tibial anterior.

* Aisladamente se detectaron PUMs de gran amplitud en los pacientes 1.IV-12 (cuádriceps y primer interóseo dorsal), 1.IV-37 (TA y EDC), 1.IV-69 (cuádriceps y tríceps) y 4.IV-2 (cuádriceps y TA).

7. IMAGEN MUSCULAR (TAC/RM MUSCULAR)

Las pruebas de imagen muscular se han practicado en 23 individuos afectos y en ocho sujetos clínicamente indeterminados de las familias de *La Safor* y a su vez, en tres pacientes de las familias 5, 6 y 7.

En la tabla 7 se muestra la gradación de la afectación de los grupos musculares de los pacientes objeto de este estudio, empleando la escala semicuantitativa descrita en la metodología.

La evaluación de las pruebas de imagen muscular, ha puesto de manifiesto un patrón de afectación muscular homogéneo y superponible en los pacientes pertenecientes a las diferentes familias, para un grado de afectación similar, con escasas excepciones.

Así pues, en todos los pacientes se observó una afectación predominante, y en ocasiones selectiva, de la musculatura del compartimento anterior de la pierna (músculos tibial anterior, *extensor digitorum longus* y *extensor hallucis longus*), en diferente grado (Figura 6).

En pacientes con un fenotipo leve la afectación muscular quedó restringida a este compartimento mientras que en individuos con afectación moderada a grave se constató una participación frecuente de la musculatura pélvico-femoral (Figura 7).

De este modo, fuera del compartimento anterior de la pierna el músculo más frecuentemente implicado fue el vasto femoral, mostrando infiltración grasa en 16 pacientes, de forma marcada (M2-3) en 12 de ellos, seguido del aductor largo, afecto en 13 pacientes, en cinco de ellos en grado moderado-grave. Los diferentes vientres musculares del vasto femoral se vieron implicados prácticamente de forma similar, aunque quizás el vasto medial se afectó en menor medida. Por otro lado, aunque se objetivaron cambios de señal en musculatura glútea en la mayoría de pacientes evaluados, solamente en una tercera parte de ellos la afectación fue moderada-grave.

En contraposición, la musculatura del compartimiento lateral y posterior de las piernas y el músculo recto femoral se preservaron hasta estadios muy avanzados de la enfermedad. Cuando estos músculos se vieron implicados lo hicieron con el siguiente gradiente decreciente: peroneo lateral > soleo > tibial posterior > *gastrocnemius* medial > *gastrocnemius* lateral > recto femoral. Como excepción encontramos tres pacientes (1.IV-37, 4.IV-6 y 6.IV-4) en quienes se objetivó una infiltración grasa reemplazando a la práctica totalidad de los músculos soleos, tibial posterior y gemelos respectivamente. También resulta llamativa la afectación del peroneo lateral (M2/2+) en el paciente 3.IV-11, con un grado de sustitución por tejido fibro-adiposo similar al de los músculos del compartimiento anterior de la pierna.

Por otro lado, además del reemplazamiento muscular por tejido fibro-adiposo, propio de los procesos miopáticos, en 11 pacientes, con edades superiores a los 39 años, se objetivó disminución del volumen muscular (atrofia) en muslos, sobre todo afectando a músculos sartorio, *gracillis* y musculatura del compartimiento posterior del muslo. En contraposición, 12 pacientes presentaron hipertrofia de músculos del compartimiento posterior de la pierna.

Al evaluar las secuencias *STIR* de la RM muscular, se evidenció “edema” muscular en 16 pacientes, mayoritariamente a nivel del músculo tibial anterior (12), seguido por musculatura de muslos (6) fundamentalmente afectando a los tres vientres del vasto femoral, compartimiento posterior de pierna (5), *extensor digitorum longus* (4) y glúteos (2).

En 13 pacientes la afectación muscular fue asimétrica, siendo marcada dicha asimetría en cinco de ellos.

Finalmente, en relación a los hallazgos de imagen muscular en los sujetos clínicamente indeterminados, en ninguno de los casos se encontraron alteraciones significativas. Al reevaluar retrospectivamente los hallazgos de RM en tres de los sujetos clínicamente indeterminados en los que genéticamente se comprobó que padecían la miopatía (1.V-31, 1.V-35 y 1.V-47), solamente pudo determinarse un leve aumento del tejido conectivo en el compartimiento del *extensor hallucis longus*.

Tabla 7a. Gradación de la afectación muscular mediante técnicas de imagen muscular.

| Sujeto | Edad | TA | EDL | PR | TP | SL | GM | GL | RF | VL | VI |
|---------|------|--------|----------|-------|----------|----------|--------|------|--------|----------|----------|
| 1.IV-12 | 62 | M3/3 | M1/2 | M1/1 | M1+/1 | M2-/2- | M1/2- | M1/1 | M1/1 | M3/3 | M3/3 |
| 1.IV-24 | 57 | M3/3 | M3/3 | M3/2 | M1/2-3 | M2/2-3 | M1/1 | M0/0 | M1/2 | M3/3 | M3/3 |
| 1.IV-26 | 53 | M3/3 | M2/3 | M0/0 | M0-1/0-1 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M2-3/2-3 | M2-3/2-3 |
| 1.V-12 | 39 | M3/2 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.V-27 | 33 | M2/2-3 | M2/2-3 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M2-3/2-3 | M2/1 |
| 1.V-31 | 22 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.VI-6 | 12 | M2-3/2 | M2/1 | M0/0 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M0/0 |
| 1.IV-35 | 54 | M3/3 | M2/1-2 | M1/1 | M0-1/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M0/1 |
| 1.IV-37 | 47 | M3/3 | M2/2 | M0/0 | M0/0 | M3/3 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M2-3/2-3 | M2-3/2-3 |
| 1.V-35 | 28 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.IV-48 | 49 | M2/2-3 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.V-47 | 25 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.V-48 | 23 | M2/1 | M1-2/1-2 | M1/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.IV-63 | 70 | M3/2-3 | M2/1 | M1/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M2/1 | M2/1 |
| 1.IV-69 | 65 | M3/3 | M3/3 | M0/M1 | M0/0 | M0-1/0-1 | M0/0-1 | M1/0 | M0/1-2 | M3/3 | M3/3 |
| 1.V-63 | 39 | M1/2 | M1-/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 2.III-5 | 56 | M3/3 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1-2/1 | M1-2/1 |
| 2.III-7 | 51 | M3/3 | M2/1+ | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M2-/1 | M1/0 | M0/0 | M3/3 | M3/3 |
| 2.IV-5 | 21 | M1/2-3 | M2/2 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 3.IV-2 | 51 | M3/3 | M3/3 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M2/2 | M2/2 |
| 3.IV-11 | 40 | M2/2+ | M2/2+ | M2/2+ | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 3.V-1 | 24 | M3/3 | M3/2-3 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/1 | M0/1 |
| 4.IV-2 | 54 | M3/3 | M3/3 | M1/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M1/1 |
| 4.IV-6 | 46 | M3/3 | M3/3 | M0/0 | M2/3 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M0/0 | M3/3 | M2-/2- |
| 4.IV-7 | 41 | M3/3 | M3/3 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | N.e | N.e | N.e |
| 4.V-2 | 30 | M3/2 | M3/3 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 5.III-1 | 53 | M3/3 | M3-/3- | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 6.IV-4 | 39 | M3/3 | M3/3 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M3/3 | M3/3 | M0/0 | M3/2 | M3/2 |
| 6.V-2 | 12 | M3/2-3 | M2-3/3 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |

Edad a la que se realizó el estudio en años. Izquierda/derecha.

Abreviaturas: AL, aductor largo; Axial, musculatura axial; BF, bíceps femoral; EDL, *extensor digitorum longus*; G, *gracillis*; GLU, glúteo mayor; GM, *gastrocnemius* medial; GL, *gastrocnemius* lateral; N.e, no evaluado; PR, peroneo lateral; RF, recto femoral; S, sartorio; SL, soleo; SM, semimembranoso; ST, semitendinoso; TA, tibial anterior; TP, tibial posterior; VI, vasto intermedio; VL, vasto lateral; VM, vasto medial.

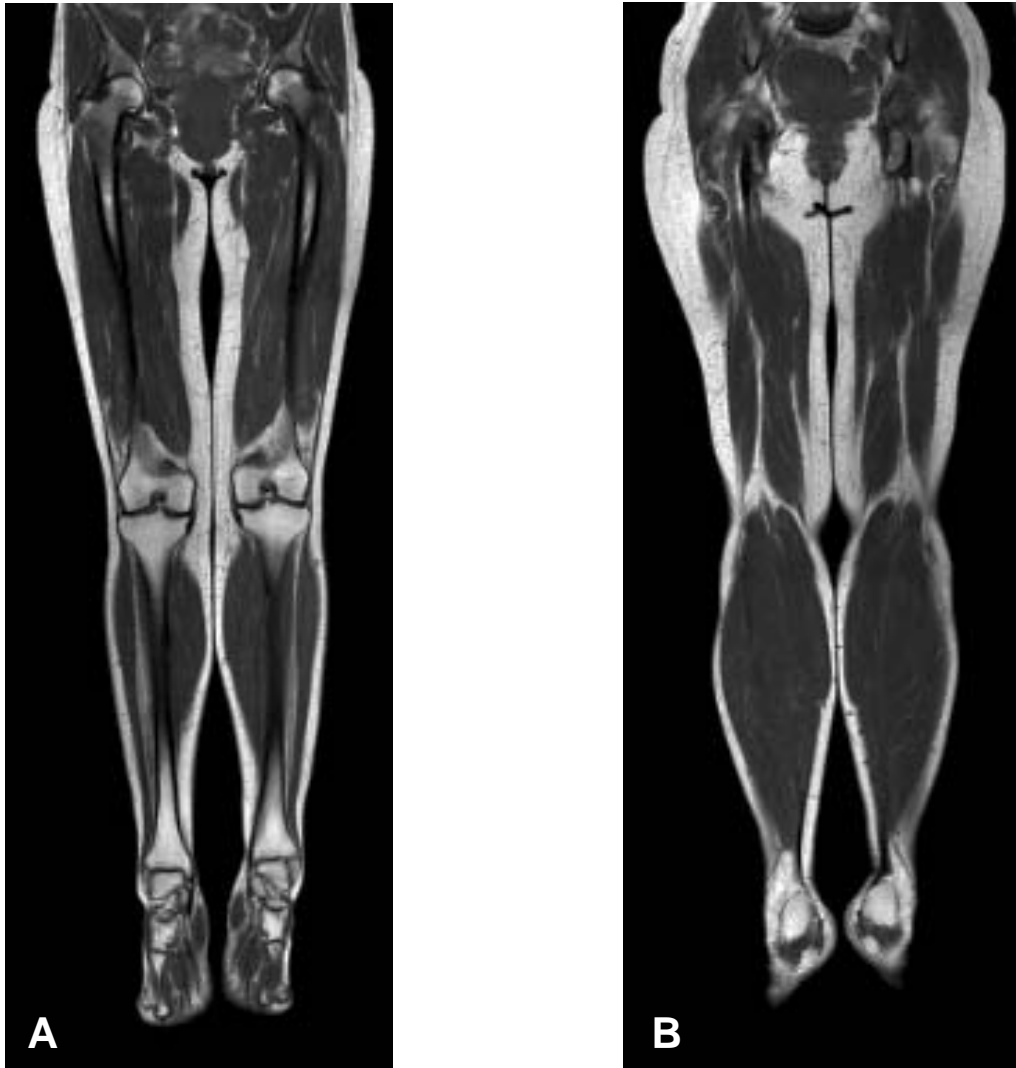
Tabla 7b. Gradación de la afectación muscular mediante técnicas de imagen muscular.

| Sujeto | Edad | VM | S | BF | ST | SM | AL | G | GLU | AXIAL |
|---------|------|----------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1.IV-12 | 62 | M3/3 | M1/1 | M2/2 | M1/1 | M2/2 | M2/2 | M0/0 | M2/2 | M2/2 |
| 1.IV-24 | 57 | M3/3 | M1/2 | M3/3 | M2/2 | M2/1 | M3/3 | M1/1 | M3/3 | M3/3 |
| 1.IV-26 | 53 | M2-3/2-3 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M2/1 | M1/1 | M0/0 | M1/1 | M1/1 |
| 1.V-12 | 39 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M1/1 |
| 1.V-27 | 33 | M2-3/2-3 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M0-1/0-1 | M0-1/0-1 | M0/0 | M1/1 | M0/0 |
| 1.V-31 | 22 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.VI-6 | 12 | M0/0 | M1/1 | M0-1/0-1 | M0-1/0-1 | M0-1/0-1 | M0-1/0-1 | M0/0 | M1/1 | M0/M0 |
| 1.IV-35 | 54 | M0/1 | M1/1 | M0/0 | M1-2/1 | M0-1/0-1 | M2/2 | M1/1 | M2/2 | M2/2 |
| 1.IV-37 | 47 | M2/2 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M1/1 |
| 1.V-35 | 28 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.IV-48 | 49 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | N.e |
| 1.V-47 | 25 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.V-48 | 23 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 1.IV-63 | 70 | M2/1-2 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M0/0 | M1/1 | M1/1 |
| 1.IV-69 | 65 | M3/3 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M1/2 | M0/0 | M0-1/0-1 | M1/1 | M1/1 |
| 1.V-63 | 39 | M0/0 | M1/1 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M1/1 | N.e |
| 2.III-5 | 56 | M1/1 | M1-0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0-1 | M1/1 |
| 2.III-7 | 51 | M3/2 | M1/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1- | M0/0 | M1/1 | M2/2 |
| 2.IV-5 | 21 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 3.IV-2 | 51 | M1/1 | M0/0 | M2/2 | M1/2 | M1/2 | M2/1 | M0/0 | M1/1 | M1/1 |
| 3.IV-11 | 40 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 3.V-1 | 24 | M0/1-2 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/2 | M1/1 | M1/1 |
| 4.IV-2 | 54 | M1/1+ | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M1/1 | M0/0 | M1/1 | M1/1 |
| 4.IV-6 | 46 | M2/2 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M1/1 | M2/2 | M1/1 | M2/2 | M2/2 |
| 4.IV-7 | 41 | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e | N.e |
| 4.V-2 | 30 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 |
| 5.III-1 | 53 | M0/0 | M0/0 | M1/0 | M0/0 | M2/0 | M0/0 | M0/0 | M1/1 | M1-2/1-2 |
| 6.IV-4 | 39 | M3/2 | M1-2/1 | M0/0 | M1-2/1 | M0/0 | M3/3 | M1/1 | M2/2 | M1/1 |
| 6.V-2 | 12 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0/0 | M0-1/0-1 | M0/0 |

Edad a la que se realizó el estudio en años. Izquierda/derecha.

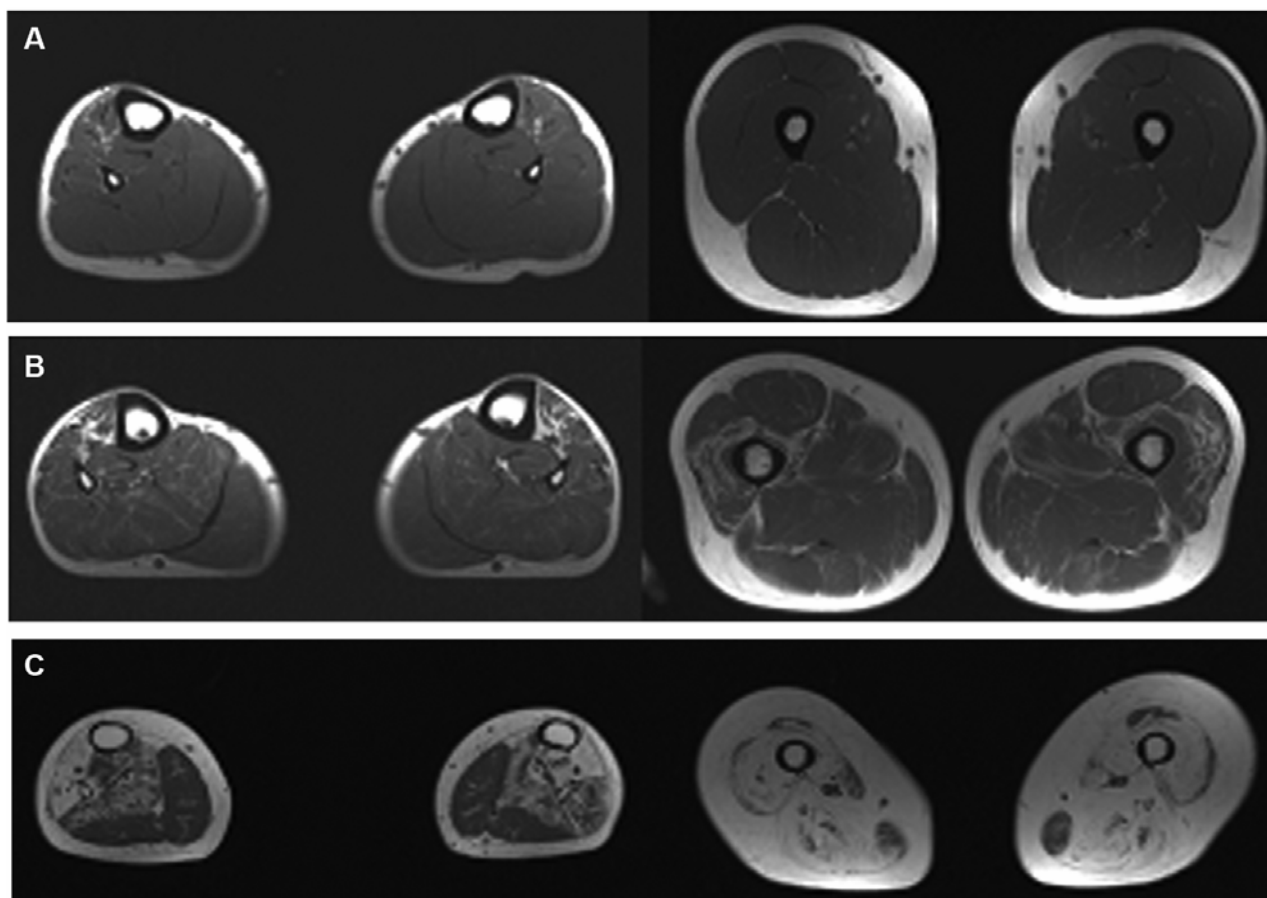
Abreviaturas: AL, aductor largo; Axial, musculatura axial; BF, bíceps femoral; EDL, *extensor digitorum longus*; G, *gracilis*; GLU, glúteo mayor; GM, *gastrocnemius* medial; GL, *gastrocnemius* lateral; N.e, no evaluado; PR, peroneo lateral; RF, recto femoral; S, sartorio; SL, soleo; SM, semimembranoso; ST, semitendinoso; TA, tibial anterior; TP, tibial posterior; VI, vasto intermedio; VL, vasto lateral; VM, vasto medial.

Figura 6. Corte coronal de RM muscular en un paciente de *La Safor* mostrando la afectación selectiva de la musculatura tibial anterior.



Secuencia T1 coronal de RM que muestra en A) la afectación selectiva de la musculatura tibial anterior de la pierna, con preservación de otros grupos musculares; nótese en B) la preservación e hipertrofia de la musculatura del compartimento posterior de la pierna.

Figura 7. RM muscular en pacientes de *La Safor* con diferente gravedad clínica.



Cortes axiales T1 de RM muscular a nivel de la pierna (izquierda) y del muslo (derecha) en tres pacientes procedentes de familias de *La Safor* con diverso grado de afectación. En A) puede verse el incipiente reemplazamiento fibro-adiposo restringido a la musculatura del compartimento anterior de la pierna, con preservación del resto de músculos en el paciente 1.V-48 de 23 años de edad. B) corresponde al paciente 1.V-27 de 33 años de edad con un grado de afectación moderada; además de la afectación de la musculatura del compartimento anterior de la pierna se aprecia una infiltración grasa manifiesta de músculos vastos femorales e incipiente a nivel de músculos aductores largos, estando preservados el resto de músculos. En C) se muestra la grave afectación muscular en la paciente 1.IV-24 a los 57 años de edad, con reemplazamiento prácticamente completo de los músculos del muslo a excepción del músculo *gracillis*, el cual está parcialmente respetado; a nivel de la pierna la preservación de *gastrocnemius* medial y lateral contrasta con la total sustitución por tejido graso de la musculatura anterior de la pierna y parcial de la musculatura del compartimento lateral, de forma asimétrica.

8. CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

Se ha procedido a la realización de biopsia muscular en 6 sujetos afectos los cuales previamente han firmado el consentimiento informado específico y estándar de este procedimiento. A su vez, se han reevaluado 12 biopsias musculares realizadas con anterioridad al inicio de este estudio y en los casos en los que se disponía de tejido muscular congelado se han realizado cortes y técnicas adicionales.

Las características patológicas de las biopsias musculares de los pacientes pertenecientes a las familias de *La Safor* y de las familias 5, 6 y 7 se detallan respectivamente en las tablas 8a y 8b.

Tabla 8a-1. Hallazgos patológicos en las biopsias de los pacientes de la familia 1 de *La Safor*.

| Sujeto | 1.IV-24 | 1.IV-26 | 1.IV-69 | 1.V-27 | 1.V-27 | 1.V-31 |
|--|-----------|--------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
| Músculo | Deltoides | Gastrocn | Gastrocn | TA | Gastrocn | TA |
| Edad/ Duración de los síntomas (años) | 49/25 | 53/23 | 64/59 | 24/23 | 31/30 | 22* |
| Debilidad del músculo biopsiado | Moderada | - | - | Grave | - | Ligera |
| Aumento variabilidad tamaño de las fibras/ Fibras tipo 1 anormalmente pequeñas | + / - | + / - | + / - | + / - | + / + | + / + |
| Incremento núcleos centrales | Leve | Sí | Leve | - | Sí | Sí |
| Necrosis | - | Ocasional | - | - | - | - |
| Fibras en división | - | + | - | - | + | - |
| Predominio de fibras tipo 1/ Aumento de fibras tipo 2C | + / - | + (>90%) / - | + / - | + (>90%) / - | + (>90%) / + | + / + |
| Agrupamiento de tipo de fibras | - | + | + | - | + | - |
| Atrofia de fibras | Ocasional | Ocasional | Ocasional | Ocasional + 1 grupo pequeño | Ocasional + 1 grupo pequeño | Ocasional |
| Agrupamiento de núcleos | - | + | - | - | - | + |
| Fibras apolilladas | - | + | + | - | + | + |
| Fibras con cores/ minicores | - | + | + | - | + | + |
| Proliferación mitocondrial/ FRR | + / + | + / + | + / + | + / - | + / - | + / - |
| Invaginaciones y vesículas sarcolemiales/ Expresión intracitoplasmática de proteínas de membrana | - / - | + / + | - / + | - / - | + / + | N.e |
| Fibras intermedias | - | Frecuentes | Ocasionales | N.e | Frecuentes | + |

Abreviaturas: *, asintomático; FRR, fibras rojo-rotas; Gastrocn, *gastrocnemius*; -, no objetivado; N. e, no evaluado; Nr, normal; TA, tibial anterior.

Tabla 8a-2. Hallazgos patológicos en las biopsias de los pacientes de las familias 2, 3 y 4.

| Sujeto | 2.III-5 | 2.III-7 | 2.III-7 | 3.IV-2 | 3.V-1 | 3.V-1 | 3.V-1 | 4.IV-6 |
|---|-----------|-----------|--------------|--------------|----------|--------------|--------------|-----------|
| Músculo | Deltoides | Deltoides | TA | TA | Gastrocn | TA | Deltoides | Deltoides |
| Edad/ Duración de los síntomas (años) | 54/49 | 45/40 | 45/40 | 51/3 | 7/5 | 9/7 | 16/14 | 32/30 |
| Debilidad del músculo biopsiado | Ligera | Ligera | Grave | Grave | - | Grave | - | - |
| Aumento variabilidad tamaño de las fibras/ Fibras tipo 1 anormalmente pequeñas | + / + | + / + | + / + | + / - | + / + | + / + | + / + | + / + |
| Incremento núcleos centrales | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Necrosis | Ocasional | - | - | - | - | - | - | - |
| Fibras en división | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Predominio de fibras tipo 1/ Aumento de fibras tipo 2C | + / - | + / - | + (>90%) / + | + (>90%) / - | - / - | + (>90%) / + | + (>90%) / + | + / - |
| Agrupamiento de tipo de fibras | - | - | - | - | - | + | + | - |
| Atrofia de fibras | + | - | + | + | - | + | + | - |
| Agrupamiento de núcleos | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Fibras apolilladas | + | - | + | + | - | + | + | - |
| Fibras con cores/ minicores | - | - | + | + | - | + | - | + |
| Proliferación mitocondrial/ FRR | + / + | + / - | + / + | - / - | - / - | - / - | + / + | - / - |
| Invaginaciones y vesículas sarcolemas/ Expresión intracitoplasmática de proteínas de membrana | - / - | - / - | N.e | N.e | N.e | N.e | - / - | N.e |
| Fibras intermedias | + | N.e | - | - | N.e | N.e | + | N.e |

Tabla 8b. Hallazgos patológicos en las biopsias de los pacientes de las familias 5, 6 y 7.

| Sujeto | 5.II-3 | 5.III-1 | 6.IV-4 | 7.II-1 |
|---|-----------|--------------|--------------|-----------|
| Músculo | Deltoides | TA | Gastrocn | Deltoides |
| Edad/Duración de los síntomas (años) | 75/55 | 46/23 | 37/30 | 78/73 |
| Debilidad del músculo biopsiado | Ligera | Grave | Ligera | Ligera |
| Aumento variabilidad tamaño de las fibras/ Fibras tipo 1 anormalmente pequeñas | + / + | + / + | + / + | + / + |
| Incremento núcleos centrales | Leve | Marcado | Leve | Leve |
| Necrosis | - | Ocasional | - | - |
| Fibras en división | - | + | - | - |
| Predominio de fibras tipo 1/ Aumento de fibras tipo 2C | + / - | + (>90%) / - | + (>90%) / + | + / - |
| Agrupamiento de tipo de fibras | + | + | + | + |
| Atrofia de fibras | + | Frecuente | Frecuente | + |
| Agrupamiento de núcleos | + | + | Frecuente | + |
| Fibras apolilladas | + | + | + | + |
| Fibras con cores/ minicores | - | + | + | - |
| Proliferación mitocondrial/ FRR | + / - | + / - | + / + | + / + |
| Invaginaciones y vesículas sarcolemas/ Expresión intracitoplasmática de proteínas de membrana | - / - | + / - | - / + | - / - |
| Fibras intermedias | N.e | N.e | + | + |

Abreviaturas: *, asintomático; FRR, fibras rojo-rotas; Gastrocn, *gastrocnemius*; -, no objetivado; N. e, no evaluado; Nr, normal; TA, tibial anterior.

En los pacientes de *La Safor*, se ha observado una amplia variabilidad de hallazgos patológicos y diferente grado de afectación, dependiendo del músculo biopsiado y la gravedad de su afectación (Figura 8A-C). No obstante, en todas las biopsias se ha objetivado un predominio de fibras tipo 1 y aumento de la variabilidad del tamaño de las fibras, con fibras tipo 1 anormalmente pequeñas en 64% de las biopsias. Así pues, el predominio e hipo/atrofia de las fibras tipo 1 ha sido el hallazgo más consistente (Figura 8F). Concretamente, esta alteración fue tan pronunciada en los pacientes 1.V-27 y 3.V-1 que el diagnóstico fue compatible con miopatía con desproporción congénita del tipo de fibras (CFTD). Por otro lado, la presencia de signos distróficos fue escasa, incluso en biopsias de músculos gravemente afectados y solamente en la paciente 3.IV-2 la biopsia muscular presentaba un estadio final (*end-stage*) (Figura 8C). A este respecto, únicamente se observaron fibras necróticas, de forma aislada, en dos biopsias y fibras en división en cuatro casos. En 57% de las biopsias se halló un incremento de los núcleos centrales. Además de estos hallazgos inespecíficos, en la mitad de las biopsias se observaron inclusiones sarcoplásmicas, que en la tinción de tricromo de Gomori aparecían como gránulos confluentes de color púrpura (Figura 8I), asemejándose a los cuerpos de inclusión tipo Mallory⁵⁸. Sin embargo, no se objetivaron cuerpos hialinos en ninguna de las muestras.

Por otro lado, en un tercio de las biopsias se apreció un agrupamiento por tipo de fibras y en aproximadamente el 80% de ellas se observaron fibras atróficas anguladas (Figura 8E, D, H). Ambos rasgos son considerados neurógenos junto con el agrupamiento nuclear (*nuclear clumps*), detectado en 28% de los casos. La atrofia afectó a fibras tipo 1 y 2, mayoritariamente de forma aislada, siendo más frecuente en las fibras tipo 1. En cinco biopsias se objetivó un incremento de fibras tipo 2C mediante ATPasa (Figura 8G).

La alteración histoquímica más significativa fue una pobre diferenciación de tipos de fibras mediante tinciones oxidativas y la irregularidad en la actividad de los enzimas oxidativos, detectadas en la mayoría de las biopsias. Dicha alteración frecuentemente afectó a la fibra muscular de forma parcheada dando una imagen de

fibra apolillada, aunque en más de la mitad de los casos llegó a constituir *cores* y *minicores*, en ocasiones múltiples (Figura 8K, L). Esta actividad oxidativa anormal se detectó en ambos tipos de fibras, formando estructuras tipo core predominantemente en las fibras tipo 1 mientras que las fibras tipo 2 mostraron con más frecuencia un aspecto apolillado.

Otro hallazgo patológico relevante fue la proliferación mitocondrial tanto a nivel subsarcolémico como intermiofibrilar, observada en diez biopsias mediante la tinción SDH y en seis de ellas constituyendo fibras rojo-rotas (Figura 8J, K).

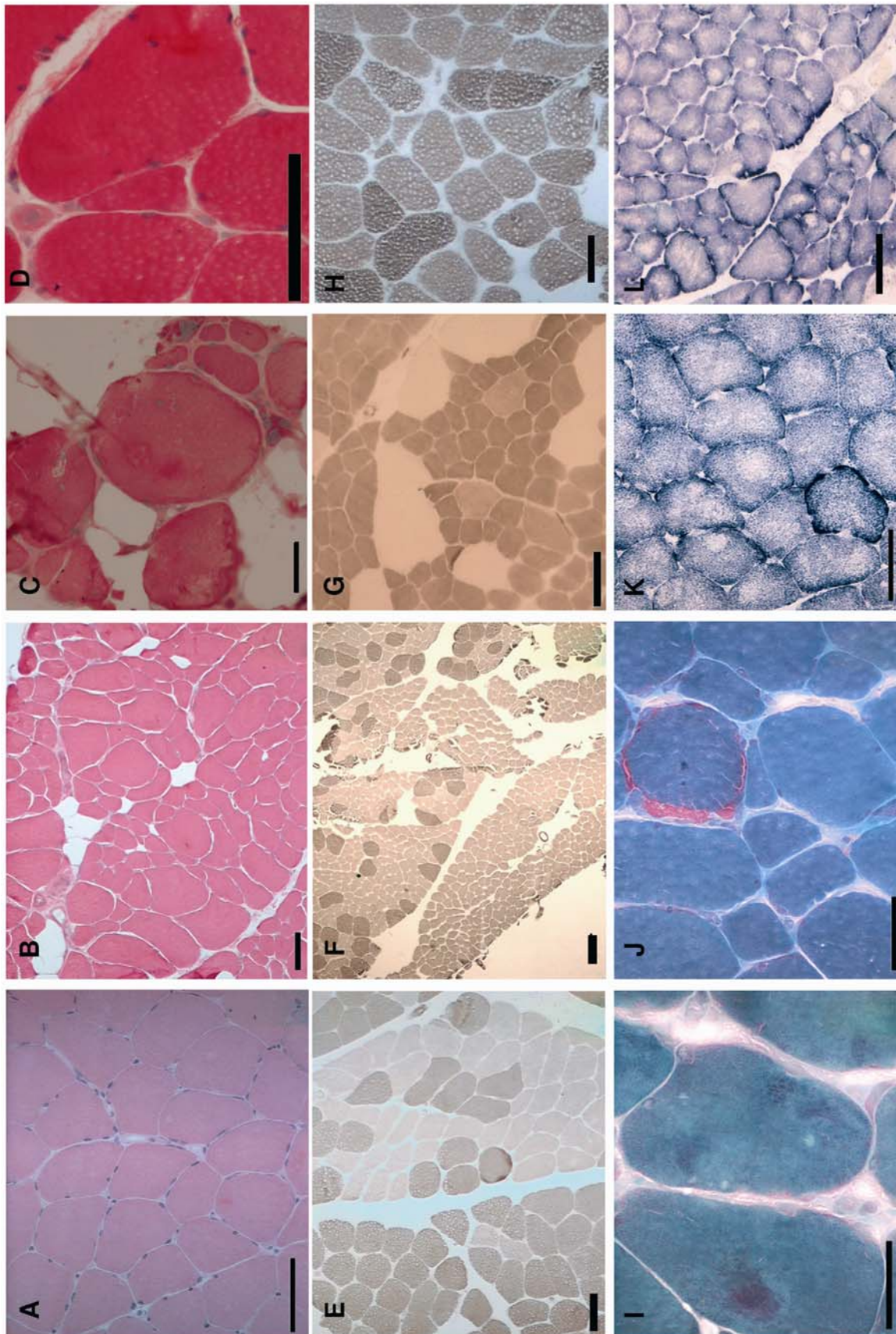
Aisladamente se objetivó una única vacuola, no ribeteada, en una de las biopsias.

En cuanto a los hallazgos inmunohistoquímicos destacó la presencia de fibras con expresión híbrida de miosina lenta y rápida (fibras intermedias), las cuales se objetivaron en siete biopsias, lo que confirma una ligera mayor sensibilidad de estas técnicas para detectar fibras con una diferenciación anormal respecto a la ATPasa. Asimismo, en dos biopsias se encontraron invaginaciones de membrana y vesículas sarcolemas junto con pequeños depósitos citoplasmáticos de proteínas de la membrana plasmática de forma aislada. No se objetivaron otras alteraciones en las técnicas de inmunohistoquímica.

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se demostró la expresión normal de la isoforma lenta de la miosina en los miofilamentos (Figura 9A), aunque su distribución fue un tanto irregular en tres biopsias (Figura 9B). Además, se detectó una sobreexpresión de desmina y $\alpha\beta$ -cristalina en las áreas correspondientes a los cores y de forma inespecífica en fibras atroficas (Figura 9C). No se objetivaron otras anomalías salvo depósitos subsarcolémicos aislados de miotilina y $\alpha\beta$ -cristalina en la biopsia del paciente 1.IV-26.

La expresión de proteínas en el músculo se analizó mediante técnicas de Western Blot en biopsias procedentes de siete pacientes (1.IV-26, 1.IV-69, 1.V-27, 1.V-31, 2.III-5, 2.III-7 y 3.V-1). Dicha expresión fue normal en todos los casos, exceptuando una disminución de calpaína 3, siendo prácticamente indetectable, observada en dos biopsias.

Figura 8. Rasgos patológicos de las biopsias musculares de los pacientes de *La Safor*.

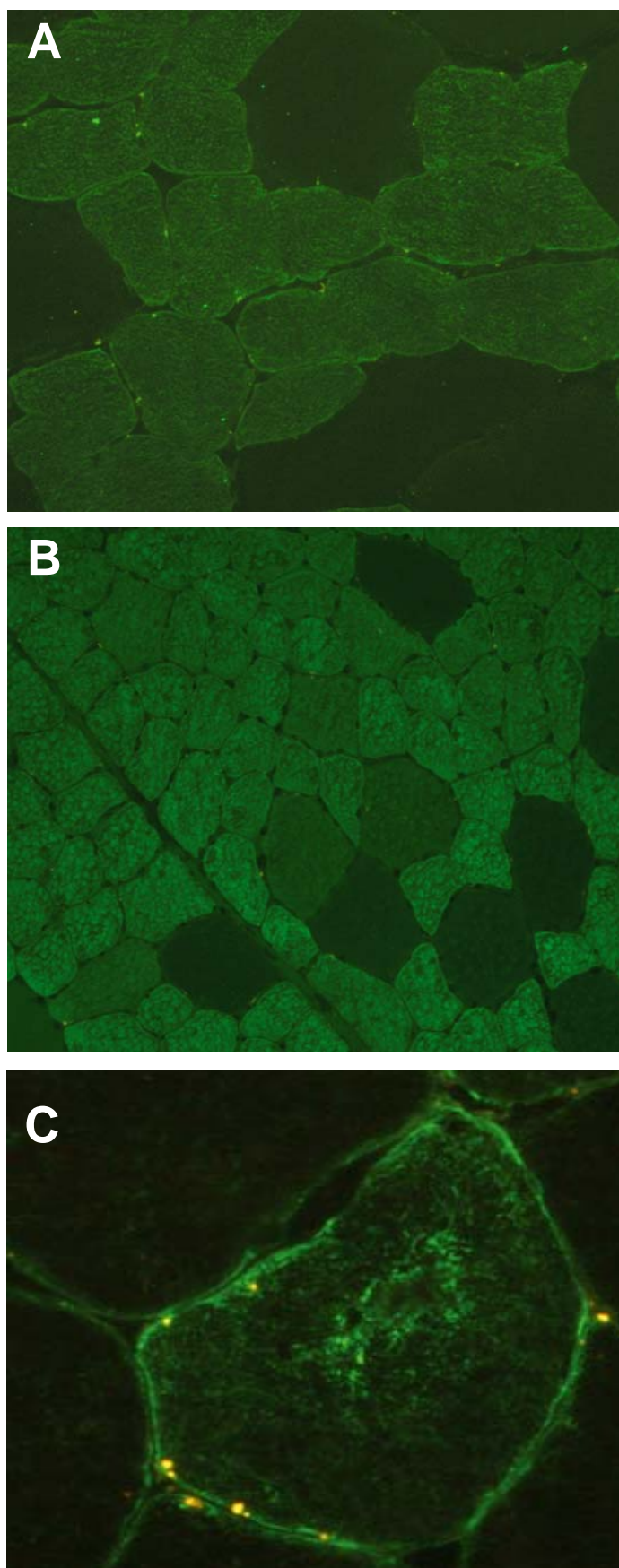


Pie Figura 8: Las fotos A-C representan biopsias musculares con diferentes perfiles patológicos, concretamente en A) el músculo presenta una apariencia normal (paciente 1.IV-69); B) muestra un incremento en la variabilidad del tamaño de las fibras musculares debido a una población dual de fibras hipertróficas y fibras hipotróficas/atróficas, nótese también el moderado reemplazamiento de tejido muscular por tejido fibro-adiposo (paciente 2.III-7); en C) se aprecian cambios distróficos graves, con reemplazamiento fibro-adiposo de prácticamente todo el músculo, el cual se encuentra en un estadio final (paciente 3.IV-2). La imagen D es un detalle que muestra una fibra atrófica angulada junto a una pequeña fibra regenerativa. Las imágenes E-G representan diferentes patrones de distribución y diferenciación de fibras por tipos: E) ejemplifica el agrupamiento por tipo de fibras (paciente 1.IV-69); F) muestra el pronunciado predominio e hipotrofia de las fibras tipo 1 (2.III-7); G) es compatible con desproporción congénita del tipo de fibras, nótese además la abundancia de fibras tipo 2C (paciente 1.V-31). En H) puede observarse un pequeño grupo de fibras atróficas anguladas de ambos tipos. Las anomalías estructurales de las fibras musculares y las alteraciones en la actividad de los enzimas oxidativos se representan en I-L. Concretamente en I) se muestra la presencia de inclusiones sarcoplásmicas similares a las inclusiones tipo Mallory (paciente 1.IV-69); en J) se aprecia una fibra rojo-rota (2.III-5); K) muestra los cores centrales o periféricos, bien delimitados junto con una fibra fuertemente reactiva con la tinción SDH (paciente 1.IV-69); en L) se observa que la tinción SDH no diferencia el tipo de fibras junto con la presencia de fibras apolilladas de gran tamaño y fibras pequeñas con cores (1.V-27).

Hematoxilina-eosina (A-D); ATPasa pH 9.4 (E,F,H) y pH 4.35 (G); tinción de tricromo de Gomori modificado (I,J); SDH (K,L).

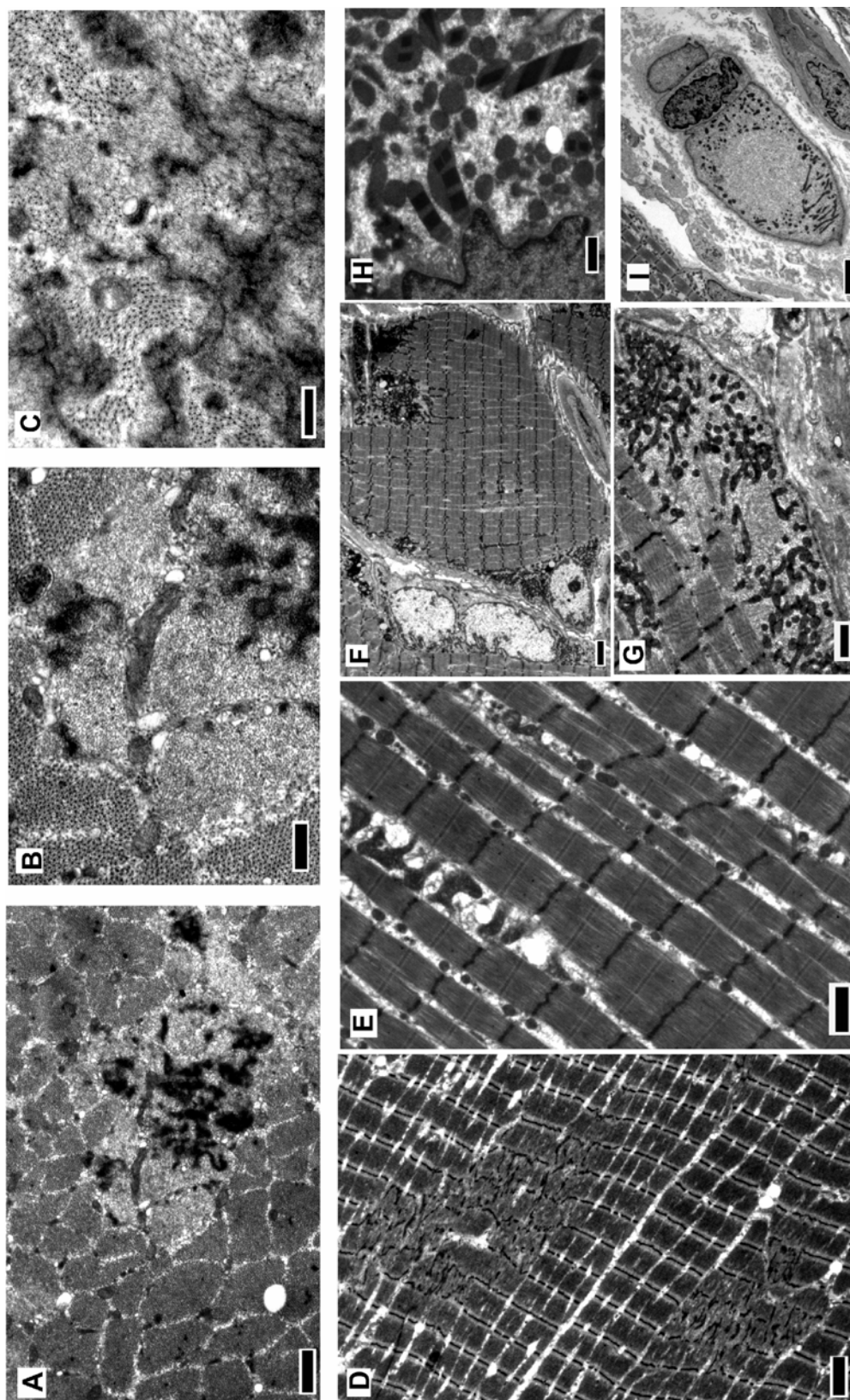
Las barras corresponden a 100 μ en A-E y G,H,J-L; a 200 μ en F y a 50 μ en I.

Figura 9. Inmunofluorescencia de las biopsias musculares de los pacientes de *La Safor*.



Pie Figura 9: Las imágenes A y B (miosina lenta x20) muestran la expresión y distribución de la miosina lenta en los miofilamentos, siendo en A) normal (paciente 1.IV-26) mientras que en B) la tinción es irregular en algunas miofibras, las cuales muestran ciertas áreas redondeadas carentes de tinción (paciente 1.V-27). Nótese también la ausencia de agregados de miosina lenta junto con la predominancia de las fibras tipo 1 (fibras lentas), las cuales presentan un diámetro menor que las fibras tipo 2. La imagen C) (desmina x40) muestra en detalle el depósito de desmina en una fibra muscular delineando lo que corresponderá a una estructura tipo core (paciente 1.IV-69).

Figura 10. Hallazgos ultraestructurales en las biopsias musculares de los pacientes de *La Safor*.



Pie Figura 10: Las imágenes A-C corresponden a cortes transversales y muestran detalles de un core, abruptamente delimitado y que abarca varias miofibrillas. La lesión core está parcial o totalmente vacía de filamentos gruesos y contiene depósitos de un material electrodenso y elementos túbulo-vesiculares. A mayores aumentos (B,C) se visualizan los agregados de material cuya densidad es similar a la del disco Z, los cuales tienden a converger. En los cortes longitudinales (D-F) se representan diferentes anomalías de las fibras musculares: en D) se aprecian dos minicores contiguos; nótese las irregularidades de la línea Z (ondulación) y la disrupción de la estructura sarcomérica. E) muestra múltiples focos intermiofibrilares de edema y dilatación de las triadas, con preservación de la estructura del sarcómero. En F-H se representan las anomalías mitocondriales: F) y G) muestran los agregados de mitocondrias a nivel subsarcolémico e intermiofibrilar; en H) se observa la presencia de mitocondrias con formas abigarradas e inclusiones para-cristalinas. I) muestra un mioblasto y una célula satélite activada, en el extremo inferior derecho de la imagen.

Las barras corresponden a 10 μ en A,H; 5 μ en B,C; 50 μ en D,F,I; y 20 μ en E,G.

Los hallazgos patológicos en las biopsias de los pacientes pertenecientes a las familias 5-7 fueron superponibles a los de los pacientes de *La Safor*, observándose en todas las biopsias un predominio e hipotrofia de fibras tipo 1, proliferación mitocondrial (incluyendo FRR en tres casos) e irregularidades en las tinciones oxidativas, frecuentemente en forma de fibras apolilladas y formando estructuras tipo *core* en dos biopsias. Como excepción, en la biopsia de la paciente 6.IV-4 perteneciente a la familia 6 se observó un infiltrado inflamatorio endomisial compuesto por células mononucleadas. A su vez, en esta muestra se visualizó con la tinción de tricrómico de Gomori la presencia de depósitos intracitoplasmáticos similares a los cuerpos de inclusión tipo Mallory. Asimismo, las técnicas de inmunohistoquímica pusieron de relevancia la expresión intracitoplasmática de algunas proteínas de membrana como la distrofina y depósitos granulares finos de desmina en esta biopsia, los cuales fueron corroborados mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Finalmente, ocho biopsias procedentes de pacientes pertenecientes a diferentes familias, se valoraron mediante microscopía electrónica. A nivel ultraestructural el hallazgo más relevante fue la presencia de focos de desorganización miofibrilar y desestructuración de los sarcómeros, de extensión variable junto con ondulación (*streaming*) de la línea Z en áreas vacías de mitocondrias, constituyendo estructuras tipo *core* o *minicore*, de localización central o periférica (Figura 10A-D). En algunas biopsias se observaron múltiples áreas de desorganización miofibrilar afectando a la misma fibra formando multi-*minicores* (Figura 10D). Los cores internamente estaban parcial o totalmente vacíos de filamentos gruesos y contenían triadas dilatadas y agregados electro-densos (Figura 10B, C). En algunos casos, la alteración se limitó a la presencia de focos de edema intermiofibrilar y depleción de triadas y mitocondrias, con preservación de la estructura sarcomérica (Figura 10E). Las alteraciones mitocondriales constituyeron otro hallazgo notable, consistentes en proliferación mitocondrial; anomalías en la forma, tamaño y distribución de las mitocondrias; e inclusiones para-cristalinas intramitocondriales (Figura 10F-H). La presencia de células satélite activadas y mioblastos se observó en algunos casos (Figura 10I).

9. ESTUDIOS GENÉTICOS

Debido al fenotipo clínico y al patrón de herencia autosómico dominante se consideró que los principales genes candidatos a estudio eran el gen *TTN*, que codifica la titina y el gen *MYH7*, que codifica la cadena pesada de la β -miosina lenta. Por ello, en una primera fase se secuenciaron los exones Mex5 y Mex6 del gen *TTN*, donde se localizan las mutaciones implicadas en la génesis de la miopatía distal tibial anterior, en un caso índice de la familia 1, siguiendo la metodología descrita con anterioridad²², no encontrándose alteraciones.

El otro gen candidato, era el gen *MYH7*, de 22.883 pb de longitud. Este gen, localizado en la región 14q12 y formado por 40 exones, fue el cuarto gen identificado en relación a las miopatías distales después de los genes de la disferlina^{15,59}, *GNE*²⁵ y titina²². En este gen, que codifica la cadena pesada de la miosina lenta (MyHC I), se han descrito nueve mutaciones responsables de la miopatía distal de Laing, la cual presenta analogías con el fenotipo de los pacientes del presente estudio. Dichas mutaciones se localizan entre los exones 32 y 37 del gen *MYH7*, afectando a la cola de la MyHC I, y una de ellas, p.K1617del, constituye un “punto caliente” (*hot spot*)^{10,60}.

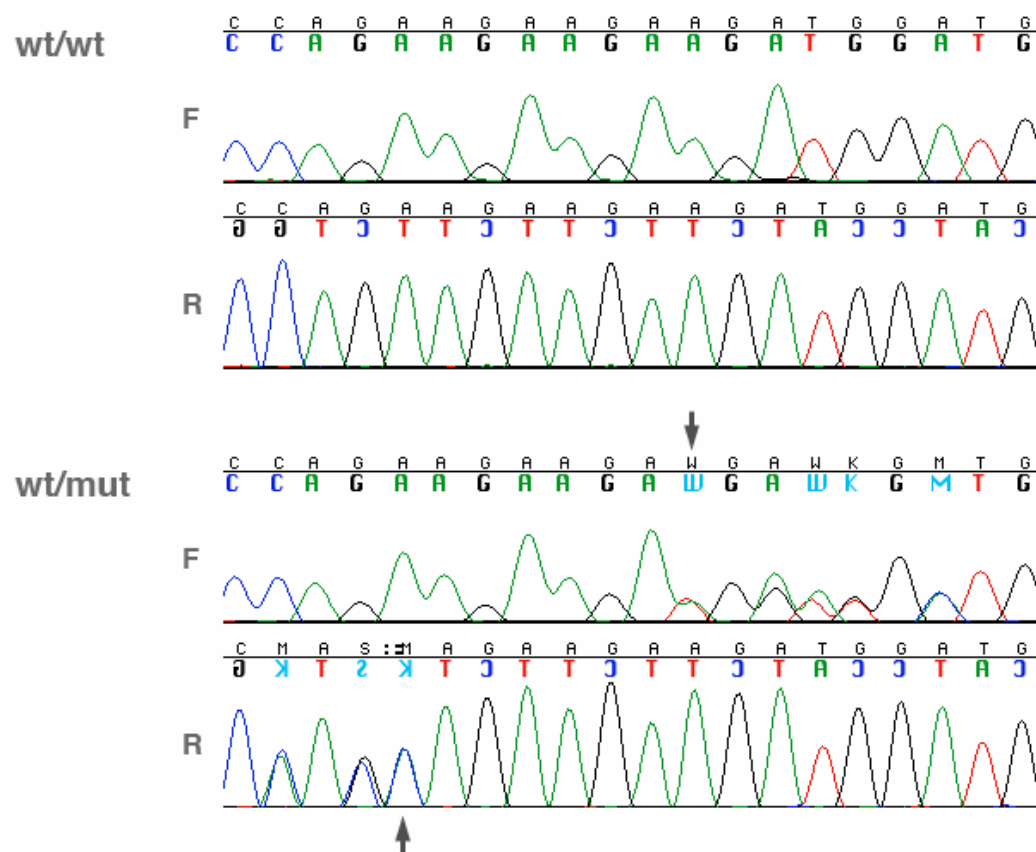
Por ello se procedió a la secuenciación de los exones 35 y 36 del gen *MYH7* en el paciente 1.IV-24, caso índice de la familia 1, empleando cebadores para amplificar ambos exones en un fragmento único (Anexo V). De esta forma, se identificó una mutación en el exón 36 del gen *MYH7* en heterocigosis, p.K1729del, que produce una delección de uno de los tres tripletes AAG consecutivos del exón 36 (Figura 11). Esta mutación en el plano proteico resulta en la delección de un residuo de Lisina.

A continuación se diseñaron cebadores para amplificar únicamente la región del exón 36 que contiene dicha mutación (Anexo V) y se procedió a la secuenciación del resto de pacientes, sujetos indeterminados y sanos de más de 35 años de edad pertenecientes a las familias de *La Safor* y de un caso índice de cada una de las familias restantes (5-7). En relación a las familias de *La Safor* se comprobó que la mutación segregaba con la enfermedad en todos los sujetos clínicamente

catalogados como afectados y también se detectó la mencionada mutación en tres individuos considerados clínicamente indeterminados, mientras que en los 23 individuos sanos testados no se detectó.

Sin embargo no se encontró dicha mutación en los pacientes de las familias 5, 6 y 7.

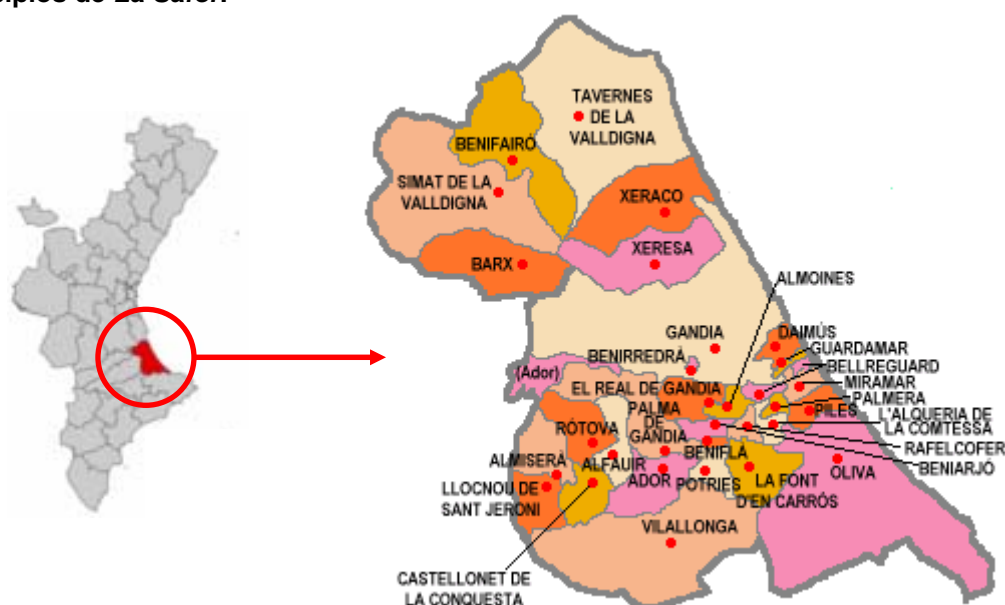
Figura 11. Secuenciación del gen *MYH7* que muestra la mutación p.K1729del en heterocigosis en la imagen inferior; en la imagen superior se indica la secuencia normal o wild type (wt).



El hecho de que las familias 1, 2, 3 y 4 procedieran de la misma región geográfica, la comarca de *La Safor* (Figura 12), apuntaba a que la mutación p.K1729del tuviese un efecto fundador. Para comprobar esta hipótesis se llevaron a cabo estudios de haplotipos en al menos un miembro sano y uno afecto de las familias 1, 2 y 3, procedentes de *La Safor*. Dicha investigación reveló que los pacientes pertenecientes a estas tres familias comparten los mismos marcadores polimórficos

de la región que comprende el gen *MYH7*. Por tanto, los estudios de haplotipos indicaron que la mutación tiene carácter fundador (Tabla 9). En relación a la familia 4, no fue necesario realizar estudios de haplotipos al ligarla genealógicamente con la familia 3.

Figura 12. Situación geográfica de la comarca de *La Safor* respecto a la Comunidad Valenciana y municipios de *La Safor*.



Nota: Los pacientes de *La Safor* proceden concretamente de las localidades de El Real de Gandía, Rótova, Alfauir, Llocnou de Sant Jeroni y La Font d’En Carrós.

Tabla 9. Análisis de haplotipos de las familias de *La Safor*.

| Marcador | Posición kb | 1.III-17 | | 1.IV-12 | | 2.III-5 | | 2.IV-2 | | 3.IV-4 | | 3.V-1 | |
|----------|-------------|----------|---|---------|---|---------|---|--------|---|--------|---|-------|---|
| D14S50 | 21.425 | 1 | 4 | 3 | 4 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 | 4 | 2 | 3 |
| D14S283 | 21.757 | 4 | 8 | 6 | 8 | 4 | 8 | 4 | 2 | 1 | 2 | 1 | 8 |
| D14S990 | 22.656 | 5 | 2 | 5 | 2 | 1 | 2 | 1 | 5 | 4 | 6 | 4 | 2 |
| D14S581 | 23.368 | 4 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| D14S264 | 24.350 | 3 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 |

En sombreado se representan los marcadores que comparten los individuos afectos. El gen *MYH7* se localiza en la secuencia de ADN entre 22.951.789-22.974.690 pb.

Adicionalmente, en el análisis de haplotipos se incluyeron tres muestras de ADN de pacientes de tres generaciones diferentes pertenecientes a la familia italo-americana descrita por P. Hedera en 2003^{61,10}, aportadas amablemente por el profesor Nigel Laing, con la misma mutación p.K1729del que las familias de este estudio. Ha resultado que los pacientes de *La Safor* poseen marcadores polimórficos diferentes respecto a los pacientes pertenecientes a la familia italo-americana, lo cual sugiere que ambas mutaciones no tienen un origen común reciente. No obstante, debido a que los marcadores polimórficos que flanquean la región en la que se sitúa el gen *MYH7* distan 712.122 pb, en una segunda fase se llevaron a cabo estudios de marcadores de polimorfismos de nucleótido único (*SNPs*). Los resultados de los marcadores *SNPs* que abarcan una región de 41.435 pb que engloba el gen *MYH7* son idénticos en pacientes de las familias de *La Safor* y de la familia de procedencia italiana (Tabla 10), lo cual indica que comparten un núcleo haplotípico común de al menos 41 kb.

Tabla 10. Análisis de haplotipos de las familias de *La Safor* en comparación con la familia Italo-Americana reportada por P. Hedera y colaboradores.

| Marcador | Posición (pb) | Familia 1 | | Familia 4 | | Familia Hedera | |
|----------------|---------------|-----------|---|-----------|---|----------------|---|
| D14S50 | 21.425.676 | 4 | 1 | | | 2 | 1 |
| D14S283 | 21.757.358 | 8 | 4 | | | 1 | 4 |
| D14S990 | 22.656.227 | 2 | 5 | | | 4 | 5 |
| rs2277474 | 22.944.363 | T | T | T | C | T | C |
| rs743567 | 22.960.822 | G | G | G | T | G | G |
| rs7157716 | 22.962.728 | G | G | G | A | G | G |
| rs1951154 | 22.967.306 | G | G | G | A | G | G |
| rs875908 | 22.977.448 | C | G | C | G | C | C |
| rs8005199 | 22.979.402 | A | A | A | A | A | T |
| rs1162360 | 22.981.247 | T | C | T | C | T | T |
| rs10873105 | 22.985.782 | T | T | T | T | T | C |
| 15 nt deletion | 22.985.798 | del | + | del | + | del | + |
| D14S581 | 23.368.349 | 2 | 4 | | | 4 | 1 |
| D14S264 | 24.349.783 | 1 | 3 | | | 2 | 4 |

En sombreado se representan los marcadores que comparten los individuos afectados. El gen *MYH7* se localiza en la secuencia de ADN entre 22.951.789-22.974.690 pb.

Respecto a las familias de procedencia diferente a *La Safor*, tras no encontrar la mutación p.K1729del en el exon 36 del gen *MYH7* se procedió a realizar estudios de haplotipos con las muestras de ADN disponibles. En la familia 5 se contaba con ADN procedente de sujetos afectados (2) y sanos (3) mientras que desafortunadamente en las familias 6 y 7 solo se disponía de ADN de individuos afectados. La presencia de individuos tanto sanos como afectados de una misma familia permite conseguir una mayor *informatividad* desde el punto de vista estadístico a la hora de localizar un determinado carácter o enfermedad, al permitir comparar los haplotipos que van ligados a la enfermedad respecto a los haplotipos de individuos sanos. En una primera fase se estudiaron los marcadores polimórficos localizados en las regiones 5' y 3' flanqueantes al gen *MYH7*, descubriendo que los sujetos afectados de las familias 5-7 presentan los mismos marcadores en dicha región (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de haplotipos de las familias 5-7.

| Marcador | 5.II-3 | | 5.II-7 | | 5.III-1 | | 5.III-2 | | 5.III-4 | | 6.IV-4 | | 6.V-2 | | 7.II-1 | | 7.III-1 | |
|----------|--------|---|--------|----|---------|---|---------|---|---------|---|--------|---|-------|---|--------|---|---------|---|
| D14S50 | 3 | 3 | 3 | 4 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 4 | 1 | 4 |
| D14S283 | 6 | 1 | 3 | 13 | 10 | 1 | 1 | 3 | 10 | 3 | 6 | 4 | 10 | 4 | 1 | 6 | 5 | 6 |
| D14S990 | 5 | 5 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 1 | 5 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 |
| D14S581 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| D14S264 | 4 | 3 | 1 | 4 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 9 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 |

En sombreado se representan los marcadores que comparten los individuos afectados. El gen *MYH7* se localiza en la secuencia de ADN entre 22.951.789-22.974.690 pb.

Por dicho motivo se procedió a secuenciar otras regiones del gen *MYH7*, completándose la secuenciación de los exones 27 al 40, sin encontrarse ninguna mutación.

El siguiente paso consiste en realizar estudios de ADN complementario (cDNA) obtenido mediante transcriptasa inversa a partir de ARN mensajero (mRNA) extraído de la biopsia muscular, para descartar mutaciones que afecten el procesamiento de los intrones (*splicing*). Estos estudios se han puesto en marcha recientemente y aun no se dispone de los resultados.

Finalmente, cabe resaltar que el abordaje genético ha contribuido a identificar en este estudio cinco sujetos asintomáticos portadores de la enfermedad pertenecientes a las familias de *La Safor*, uno de ellos en estadio presintomático. Dichos individuos tenían edades comprendidas entre 22 y 41 años, siendo la media de edad de 28 años. Únicamente en dos de ellos los hallazgos de la exploración permitieron catalogarlos indudablemente como afectados, mientras que en el resto, los signos clínicos y las alteraciones en pruebas complementarias (EMG y/o RM) fueron tan leves y/o inespecíficos que fue necesario el estudio genético para determinar que segregaban la mutación.

F. DISCUSIÓN

El planteamiento de este estudio surge del interés por catalogar un grupo de pacientes, pertenecientes a diversas familias, afectados de una miopatía con perfil distal anterior y herencia autosómico dominante. En el presente trabajo se ha estudiado un total de siete familias, lográndose identificar la causa genética subyacente en cuatro de ellas: la mutación fundadora p.K1729del en heterocigosis en el gen *MYH7*, lo cual las clasifica como miopatía distal de Laing. El estudio protocolizado de esta amplia serie de pacientes con miopatía distal de Laing, que constituye la serie más amplia reportada en relación a esta enfermedad hasta el momento, permite contribuir a una mayor aproximación a esta miopatía y asimismo, brinda la oportunidad de aclarar aspectos que hasta el momento permanecían oscuros.

La miopatía distal de Laing se produce por mutaciones en el gen de la cadena pesada de la miosina lenta (*MYH7*). Es interesante que mutaciones en este gen pueden dar lugar a otras dos entidades diferentes: miocardiopatía hipertrófica/dilatada familiar (OMIM#192600) y miopatía por depósitos hialinos (OMIM#608358), también denominada miopatía por depósitos de miosina. Se ha postulado que el fenotipo resultante depende de la localización de la mutación en el gen. De este modo, la mayoría de las más de 200 mutaciones en el gen *MYH7* descritas en relación a miocardiopatía hipertrófica o dilatada familiar se localizan en la cabeza globular de la proteína⁶² y generalmente no asocian afectación de musculatura esquelética. Por el contrario, salvo raras excepciones, las mutaciones en la cola de la MyHC I pueden dar lugar a dos variantes alélicas de miopatía esquelética: miopatía distal de Laing^{9,10} y miopatía por depósitos hialinos⁶³. Estas dos entidades se diferencian fundamentalmente a nivel patológico, ya que en la miopatía por depósitos de miosina aparecen los característicos cuerpos hialinos, depósitos de material amorfo eosinófilo, los cuales no se producen en la miopatía de Laing.

No obstante, todavía se desconoce el mecanismo por el cual mutaciones en el gen *MYH7* dan lugar a un fenotipo u otro, afectando o preservando al miocardio, y se supone que deben existir otros factores implicados aparte de la localización de la mutación en el gen. A este respecto recientemente se han publicado fenotipos mixtos combinando afectación miocárdica y esquelética, originados por mutaciones

tanto a nivel de la región globular como en la cola de la MyHC. Concretamente se han reportado dos mutaciones en la cabeza globular, localizadas en el exón 14 y el exón 16 que combinan miocardiopatía y miopatía esquelética^{64,65}; y a su vez se ha descrito una mutación en la cola, en el exón 38, en una familia con miopatía por cuerpos hialinos que asocia miocardiopatía hipertrófica⁶⁶. En relación a la miopatía de Laing, producida por mutaciones en la cola de la MyHC, únicamente se ha descrito afectación miocárdica en una de las familias publicadas⁶¹.

A continuación se desglosan por apartados los aspectos más interesantes del presente estudio.

MIOPATIA DISTAL DE LAING EN LA REGIÓN DE LA SAFOR

Diversidad fenotípica de la miopatía distal de Laing

La variedad fenotípica observada en los pacientes de *La Safor* dilata el espectro de esta miopatía en relación a diversos aspectos clínicos.

Respecto a la edad de inicio, el margen de presentación clínica se amplía hasta los 50 años de edad. Debut de la miopatía por encima de la tercera década no se había reportado con anterioridad, aunque se había sugerido la posibilidad de un inicio tardío en una familia austriaca⁶⁷. En el presente estudio además se ha identificado un individuo presintomático de 28 años de edad sin debilidad en músculos del compartimento anterior, lo que ratifica que el debut de la enfermedad puede ser más tardío de lo que se pensaba, no solo en relación a las manifestaciones clínicas sino también en cuanto a la aparición de signos característicos de esta miopatía.

A su vez, se ha observado una gran variabilidad en referencia a la edad a la que los pacientes consultaron, oscilando desde la infancia temprana hasta la séptima década de vida, aunque es destacable que la mayoría de ellos consultaron en la edad adulta, cuando la sintomatología derivada de la miopatía interfirió con sus vidas. También es remarcable que un número considerable de pacientes no había consultado previamente a la participación en este estudio en relación a síntomas derivados de su miopatía, aunque muchos de ellos referían ciertas limitaciones.

Por otro lado, el estudio de esta amplia serie de pacientes con miopatía distal de Laing confirma que la musculatura diana de esta miopatía se localiza en el compartimento anterior de la pierna, ocasionando debilidad para la extensión de pie y tobillo, pero también ha puesto de relevancia que la mayoría de pacientes presenta implicación de otros grupos, fundamentalmente musculatura flexora de cuello, extensora de dedos y de cintura pelviana, incluso a edades tempranas. En los trabajos anteriormente publicados ya había sido descrita la afectación de otros grupos musculares, concretamente musculatura extensora de muñeca y dedos, flexora de cuello, musculatura facial, troncular o de cinturas. No obstante, el patrón de afectación muscular fuera del compartimento anterior de la pierna no había sido claramente definido, y existían diferencias considerables entre las diferentes familias publicadas^{9-11,61,68-70}. Además, en dichos trabajos se había postulado que la afectación de músculos fuera del compartimento anterior de la pierna ocurría de forma secuencial¹², lo cual no se ha ratificado en este estudio, ya que encontramos pacientes jóvenes con afectación de diversos grupos musculares de forma adicional a la implicación de la musculatura anterior de la pierna, junto con individuos de mayor edad con afectación restringida a musculatura tibial anterior. No obstante, con la evolución de la enfermedad sí se ha constatado que la debilidad progresa gradualmente en los pacientes.

Asimismo, este estudio pone de relevancia una manifiesta variabilidad clínica interindividual, que incluye una pequeña proporción de sujetos asintomáticos, un número algo mayor de pacientes con afectación selectiva distal y siendo el fenotipo distal-proximal el más frecuente. Sin embargo, no se han encontrado diferencias sustanciales en el fenotipo al comparar pacientes pertenecientes a diferentes familias de la región de *La Safor*, para el mismo grado de afectación clínica.

Otro aspecto de interés en el presente estudio ha sido la posibilidad de evaluar sujetos asintomáticos afectados por esta miopatía, con edades comprendidas entre 22 y 41 años. Conviene destacar que el abordaje genético fue esencial para discernir su condición debido a que algunos de ellos manifestaban leves y/o inespecíficos signos en la exploración clínica y en las pruebas complementarias. De hecho, al examinar clínicamente a estos sujetos, en la mitad de ellos solo se encontró una debilidad mínima restringida al músculo *extensor hallucis longus*, el cual se perfila como el

primer músculo implicado en esta miopatía, seguido del *extensor digitorum longus* y tibial anterior. A este respecto, conviene ser cautos a la hora de evaluar sujetos en riesgo de padecer esta enfermedad cuando su edad es menor de 40 años.

Por otro lado, en el seguimiento evolutivo de estos pacientes se ha confirmado una progresión lenta y gradual de la enfermedad en la mayoría de casos, como ya se había reportado¹². No obstante, en los pacientes de *La Safor* la discapacidad derivada de la miopatía fue sumamente variable, oscilando desde individuos sin ninguna repercusión funcional hasta sujetos confinados en silla de ruedas, y no siempre el grado de discapacidad fue edad-dependiente, con lo que por ejemplo se han identificado sujetos asintomáticos en la quinta década de vida en contraposición con pacientes gravemente afectados a la misma edad. A su vez, aunque la mayoría de pacientes ha conservado la deambulación hasta edades avanzadas, se han registrado sujetos con mayor grado de discapacidad de lo que previamente se había descrito¹² y constatado que un porcentaje no despreciable de pacientes requirió del empleo de dispositivos de ayuda para la deambulación. A este respecto, factores relacionados con la miopatía contribuyeron a la discapacidad, como los problemas articulares secundarios al desequilibrio muscular, fracturas derivadas de caídas y las mialgias.

Así pues, la amplia variabilidad fenotípica observada en pacientes con la misma mutación, justificaría las diferencias reportadas en las series publicadas con anterioridad. A esta variedad fenotípica hay que sumar una gran variabilidad en relación a los hallazgos electrofisiológicos y patológicos previamente reportados¹², la cual a su vez emerge en este trabajo.

La constatación de la existencia de una variabilidad sustancial incluso en sujetos que comparten la misma mutación, apunta hacia la existencia de otros factores modificadores del fenotipo aún no identificados, aparte del tipo de mutación en *MYH7*.

Rasgos asociados con la miopatía distal de Laing

Respecto a otros aspectos posiblemente relacionados con la miopatía distal de Laing, destaca la alta frecuencia de deformidades en los pacientes de este estudio, fundamentalmente a nivel de los pies, junto con la presencia de paladar ojival, las cuales pueden ser reminiscencias de deformidades asociadas con otras miopatías congénitas o incluso con síndromes malformativos relacionados con la MyHC^{71,72,4}.

En trabajos anteriores únicamente se había descrito el acortamiento del tendón de Aquiles en algunos pacientes con miopatía distal de Laing^{70,12}, pero no se habían relatado otras deformidades esqueléticas.

Por otro lado, hay que remarcar que las mialgias espontáneas o relacionadas con la actividad física son una manifestación frecuente, aunque inespecífica, de la miopatía de Laing, según lo observado en este estudio. Hasta la fecha solamente se han reportado mialgias relacionadas con la actividad física en un paciente con miopatía distal de Laing perteneciente a la familia publicada por T. Voit y colaboradores⁷⁰ y en otro paciente reportado por S. Overeem con miopatía distal más miocardiopatía hipertrófica originada por una mutación en el exón 16 del gen *MYH7*⁶⁵.

Sin embargo, la asociación de otros rasgos previamente reportados y la miopatía distal de Laing puede ser controvertida. Por ejemplo, en relación al temblor descrito en algunas familias con miopatía distal de Laing¹², se ha observado en algunos pacientes de *La Safor*, siendo sus características similares a las del temblor esencial. Resulta interesante que este temblor no se relacionó con el grado de debilidad de la musculatura extensora de dedos como previamente se había sugerido, e incluso se constató su presencia en individuos sin la miopatía distal, con lo que no parece relacionado con esta enfermedad.

¿Existe evidencia de implicación del sistema nervioso periférico y del miocardio en la miopatía distal de Laing?

La posible asociación de neuropatía con la miopatía distal de Laing ha sido reportada únicamente en un paciente perteneciente a una familia alemana en el cual la biopsia de nervio sural mostró signos de hipomielinización sin formación de bulbos de cebolla⁷⁰.

El presente trabajo no apoya la implicación del sistema nervioso periférico en la miopatía distal de Laing ya que únicamente en un paciente de la amplia serie estudiada existe constancia de neuropatía asociada en base a los hallazgos neurofisiológicos, lo cual puede deberse a factores coincidentales. Sin embargo, cabe remarcar que en un porcentaje considerable de pacientes se objetivaron rasgos neurofisiológicos considerados neurógenos y en ocasiones, estos hallazgos, junto con signos patológicos propios de denervación, hicieron que el diagnóstico se orientara hacia procesos neurógenos como la atrofia muscular espinal distal o neuropatías motoras hereditarias. Dichos hallazgos revelarían la existencia de procesos de remodelación de la unidad motora, probablemente de forma secundaria a la miopatía, mas que la concurrencia de neuropatía.

Por otro lado, respecto a la implicación del miocardio en la miopatía distal de Laing, previamente había sido descrita únicamente en una familia⁶¹, la cual presenta la misma mutación p.K1729del en el gen *MYH7* que los pacientes de las familias de *La Safor*. En el presente estudio se ha detectado únicamente en un paciente la presencia de miocardiopatía, la cual puede estar relacionada con la mutación en el gen *MYH7*. Este hecho permite apuntar que la implicación del miocardio aunque posible, no es un rasgo común de esta enfermedad y pudiera producirse debido a factores coincidentales. Por tanto, aun admitiendo que la miocardiopatía pueda ser una complicación asociada a la miopatía de Laing producida por la mutación p.K1729del, a la vista de su infrecuencia en el estudio de esta amplia serie de pacientes, se concluye que no es un rasgo relevante del fenotipo. Esto tiene importantes implicaciones en el pronóstico vital y la expectativa de vida de los pacientes, los cuales no se verían afectados.

Los hallazgos de imagen muscular en la miopatía distal de Laing son homogéneos y característicos

Los estudios de imagen muscular en esta serie de pacientes con miopatía de Laing muestran un patrón de afectación muscular homogéneo, siendo la musculatura del compartimento anterior de la pierna la preferentemente implicada en esta forma de miopatía, como ya se había reportado.

Más interesante es el hecho de que estos estudios confirman que la afectación de musculatura pelviana y proximal de las extremidades inferiores ocurre con más frecuencia de lo que se creía¹². De hecho, el cuádriceps fue el segundo grupo muscular más frecuente y gravemente afecto por detrás de la musculatura anterior de la pierna. Otros músculos proximales habitualmente implicados fueron el aductor largo y glúteo.

En los trabajos anteriores sobre la miopatía distal de Laing se había considerado que el cuádriceps se “respetaba” en esta miopatía, postulando que su composición similar en fibras tipo 1 y 2 o incluso con predominio en fibras tipo 2 le “protegía” de verse afectado en esta enfermedad¹² mientras el predominio de fibras tipo 1 del músculo tibial anterior lo convertía en músculo diana. Los datos obtenidos mediante la evaluación de los estudios de imagen muscular en los pacientes de *La Safor* no refuerzan la teoría de la composición de tipo de fibras como predictor de la afectación predominante de unos músculos sobre otros, y abre la puerta a la búsqueda de otros factores implicados. Por el momento se desconoce por qué unos músculos se afectan preferentemente sobre otros, no solo en relación a la miopatía distal de Laing sino también en otras miopatías.

Otras miopatías caracterizadas por la afectación exclusiva o preferencial del compartimento anterior de la pierna son la miopatía distal de Udd (titinopatía), la miopatía de Nonaka (asociada con GNE), desminopatía, miopatía distal por mutaciones en la VCP (*valosin containing protein*) y nebulinopatía distal⁶⁰. En algunas de ellas se ha estudiado el patrón morfológico mediante técnicas de imagen muscular.

Los pacientes con miopatía de Laing objeto del presente estudio muestran un patrón radiológico homogéneo y con rasgos diferenciales en relación a otras miopatías distales anteriores. Por ejemplo, la mayor afectación de la musculatura anterior del muslo, predominantemente del cuádriceps, sobre la del compartimento posterior la diferencia de la miopatía distal de Udd⁴⁶, miopatía de Nonaka²³ y desminopatías⁷³. De forma adicional en las desminopatías, aunque el fenotipo puede ser considerablemente variable, se ha reportado la implicación de la musculatura peroneal en al menos similar grado que la tibial anterior, mientras que en el presente estudio la musculatura del compartimento lateral de la pierna se preservó generalmente hasta estadios avanzados de la enfermedad⁷³. Respecto a la nebulinopatía distal, los estudios de imagen reportados demuestran una afectación preferencial de la musculatura tibial anterior al igual que en nuestros pacientes, con preservación de otros grupos musculares de la pierna, pero no se ha especificado el patrón de afectación muscular a otros niveles³⁴.

En contraposición, existen otras miopatías con especial predilección por la musculatura del compartimento posterior de la pierna, como las disferlinopatías y algunas formas de miopatía miofibrilar, incluyendo miotilinopatías y zaspopatías⁶⁰.

A su vez, diversas miopatías incluyendo la miopatía distal de Welander, la miopatía óculo-faringo distal y algunas miopatías miofibrilares como las filaminopatías afectan simultáneamente al compartimento anterior y posterior de la pierna, a menudo de forma asimétrica.

Por otro lado conviene destacar que el patrón observado en las técnicas de imagen muscular a nivel pélvico-femoral en los pacientes del presente estudio es similar al descrito en la miopatía congénita central core (CCD)⁷⁴, con afectación preferencial de glúteos, aductores y cuádriceps. Sin embargo, en la miopatía central core la afectación a nivel de la pierna predomina en *soleo* y *gastrocnemius*, respetándose la musculatura tibial anterior hasta estadios avanzados, patrón opuesto al de los pacientes con miopatía distal de Laing reportados en este estudio.

La miopatía distal de Laing comparte rasgos patológicos de las miopatías congénitas y muestra anomalías mitocondriales

Los hallazgos patológicos fundamentales reportados en este estudio son el predominio e hipotrofia/atrofia de fibras tipo 1 y la presencia de estructuras tipo *core* y *minicore*. Ambos rasgos la mayoría de veces aparecen de forma simultánea y son comunes en las miopatías congénitas. Asimismo, se han observado anomalías mitocondriales, en relación al número, distribución y estructura de estas organelas.

La presencia de fibras tipo 1 anormalmente pequeñas o atroficas había sido descrita en algunas de las familias con miopatía distal de Laing previamente reportadas^{9-12,68}. No obstante, en dichas familias este hallazgo se acompañó de un predominio de fibras tipo 2. A su vez, aunque en algunas biopsias se habían observado irregularidades en las tinciones oxidativas en forma de fibras apolilladas⁹⁻¹¹, hasta el momento no se había reportado la presencia de estructuras tipo *core* en pacientes con miopatía distal de Laing. Sin embargo, la relación entre mutaciones del gen *MYH7* y la formación de estructuras tipo *core* había sido descrita hace más de 15 años en pacientes con miocardiopatía hipertrófica producida por mutaciones en la cabeza globular de la MyHC⁷⁵, y previamente se habían reportado alteraciones en fibras tipo 1 como atrofia y proliferación mitocondrial en pacientes con miocardiopatía hipertrófica y dilatada, en ausencia de debilidad muscular esquelética⁷⁶. Asimismo, se han descrito anomalías mitocondriales en forma de proliferación mitocondrial, con presencia de fibras rojo-rotas e inclusiones paracrystalinas intramitocondriales en un paciente con miopatía distal y miocardiopatía hipertrófica asociada, originada por una mutación en el exón 16 del gen *MYH7*⁶⁵. En la biopsia del citado paciente también se observaron ondulaciones de la línea Z.

La hipotrofia de fibras tipo 1 es un rasgo frecuente en muchas formas de miopatías congénitas y otras enfermedades neuromusculares, al igual que el predominio de fibras tipo 1. Cuando el diámetro medio de las fibras tipo 1 es 12% menor que el de las fibras tipo 2 se habla de desproporción congénita del tipo de fibras, en el contexto de un cuadro clínico compatible con una miopatía congénita y ausencia de otros rasgos estructurales como *cores* o *bastones*⁷⁷. La miopatía por desproporción congénita del tipo de fibras (CFTD) se ha asociado con diversas mutaciones en

genes que codifican proteínas sarcoméricas o del retículo-sarcoplásmico, implicadas en el proceso de excitación-contracción mediado por señales de calcio⁷⁸⁻⁸⁰. Curiosamente, los procesos de diferenciación de las fibras musculares también están relacionados con mecanismos de señal calcio-dependientes⁸¹.

Respecto a los cores, es sabido que pueden aparecer en biopsias de sujetos sin debilidad muscular afectos de hipertermia maligna⁸² y también, como se ha apuntado previamente, en pacientes con miocardiopatía secundaria a mutaciones en el gen *MYH7*. Los cores se consideran un fenómeno morfológico secundario que en si mismo no es la causa de debilidad muscular⁸³ caracterizado por áreas con ausencia de actividad enzimática oxidativa, carentes de mitocondrias, las cuales a nivel ultraestructural se corresponden con zonas en las que se produce una disrupción del patrón sarcomérico, de localización central o periférica. Constituyen el hallazgo morfológico fundamental en la miopatía central core (*CCD*), producida por mutaciones en el gen del receptor de rianodina (*RyR1*),⁸⁴ aunque también pueden aparecer en otras circunstancias, como tras tenotomía, en la atrofia neurógena o en relación a otros defectos genéticos como mutaciones en el gen de la selenoproteína N1 (*SEPN1*)⁸⁵ y en el gen de la α -actinina 1 (*ACTA1*)^{86,87}. Aunque la patogenia de los cores no se conoce a la perfección, recientemente se ha demostrado que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en relación a la miopatía por mutaciones en *SEPN1*⁸⁸.

A su vez, los minicores son un hallazgo inespecífico común a múltiples miopatías, incluyendo distrofias musculares y varias miopatías congénitas, como la distrofia muscular congénita de Ullrich producida por mutaciones en el gen *Col VI*. Es sabido que mutaciones en el receptor de la rianodina (*RyR1*) y en el gen *ACTA1* pueden dar lugar también a multi-minicores aunque el fenotipo más frecuentemente referido como enfermedad por multi-minicores es el producido por mutaciones en el gen *SEPN1*⁸⁵. En la actualidad, los cores y minicores se consideran un continuo morfológico, de modo que se emplea globalmente el término de miopatías con cores en referencia a este grupo de miopatías congénitas⁸⁹.

En el presente estudio la presencia de cores y multi-minicores en los pacientes con miopatía distal de Laing de *La Safor* se ha confirmado mediante microscopía electrónica, como focos únicos o múltiples de desorganización miofibrilar, disrupción del sarcómero y depleción de mitocondrias, predominantemente en fibras tipo 1. A nivel ultraestructural también se ha objetivado la presencia de zonas con ondulación de la línea Z y anomalías mitocondriales. Sin embargo, no se han observado depósitos de miosina constituyendo cuerpos hialinos.

Estos hallazgos apuntan a que la mutación p.K1729del conserva la morfología estructural de la miosina pero produce repercusiones funcionales en la diferenciación y maduración de las miofibras, ocasionando rasgos característicos de las miopatías congénitas.

Por otro lado, la disrupción del sarcómero se ha descrito en relación a otras proteínas sarcoméricas como la titina y la nebulina. La cola de la MyHC se localiza en la línea M del sarcómero y se conoce que interacciona con la titina⁷. Recientemente se han publicado nuevas mutaciones en el gen *TTN* afectando la región C-terminal, la cual se relaciona con la línea M, como causa de una miopatía congénita grave con miocardiopatía asociada y que a nivel patológico se caracteriza por la presencia de multi-minicores⁹⁰. En las biopsias de estos pacientes se observó la desintegración de la línea M del sarcómero, mientras que la línea Z estaba relativamente preservada, patrón opuesto a lo observado en los pacientes del presente estudio. A su vez, en las biopsias de dos de las cuatro familias publicadas con miopatía distal por mutaciones en la nebulina, las cuales presentan una mutación localizada en el exón 151, se ha reportado la presencia de estructuras *core-like*, fibras lobuladas con irregular distribución mitocondrial y anomalías en la línea Z³⁴, hallazgos superponibles a los observados en el presente estudio. Otra proteína recientemente implicada con la formación de minicores es la cofilina-2, proteína relacionada con la actina y codificada por el gen *CFL2*, cuyas mutaciones son una causa de miopatía nemalínica⁹¹.

Por tanto, de los resultados del presente estudio se deriva que en el diagnóstico diferencial de miopatías por cores o multi-minicores deben considerarse mutaciones

en el gen *MYH7*, además de mutaciones en la *RyR1*, *SEPN1* y mutaciones en diversas proteínas sarcoméricas.

En relación a la presencia de fibras híbridas o intermedias, es decir fibras que expresan a la vez la isoforma lenta y rápida de la miosina, habían sido reportadas en trabajos anteriores, en algunos casos constituyendo grandes fascículos¹². En el presente estudio se han observado fibras intermedias solamente de forma aislada. La explicación que se había sugerido acerca de la presencia de fibras híbridas es que el defecto en la miosina lenta favorecía la conversión de fibras tipo 1 en fibras tipo 2. En el presente estudio se sugiere que este fenómeno sea también el resultado de una anomalía en los procesos de diferenciación y maduración de las fibras musculares.

Por otro lado, se han observado anomalías mitocondriales en las biopsias de los pacientes de este estudio. La ausencia de mitocondrias en el core es uno de los rasgos fundamentales de este tipo de lesión patológica. La proliferación mitocondrial en la periferia del core o formando agregados subsarcolemales ha sido reportada de forma ocasional⁸³. No obstante, la proliferación mitocondrial tan marcada formando FRR observada en este estudio, junto con la presencia de mitocondrias de formas abigarradas y conteniendo inclusiones para-cristalinas, no había sido reportada previamente en relación a los cores.

Finalmente, este estudio confirma que las vacuolas ribeteadas no son un hallazgo prominente en esta forma de miopatía, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de miopatías distales, lo cual se había descrito con anterioridad¹².

¿Existe relación entre las familias de La Safor y la familia reportada por Hedera?

Como se ha expuesto con anterioridad, los pacientes de las familias de *La Safor*, comparten la misma mutación, p.K1729del, la cual presenta carácter fundador, según los estudios de haplotipos realizados. Dicha mutación había sido descrita previamente en una familia italo-americana⁶¹. Hedera y colaboradores, publicaron el estudio de doce pacientes pertenecientes a dicha familia, siendo la edad media de inicio de 20 años (rango de 14 a 34 años), menor que la de los pacientes del presente estudio, con una edad de inicio promedio de 38 años. En cuanto al fenotipo clínico, la diferencia fundamental radica en que los pacientes de la familia italo-americana no presentaron debilidad facial, de musculatura cervical ni extensora de dedos, ni siquiera en estadios avanzados de la miopatía, mientras que en los pacientes de *La Safor* estos grupos musculares frecuentemente se vieron implicados. Asimismo, únicamente una cuarta parte de los pacientes de la familia descrita por Hedera manifestaron debilidad proximal, en todos los casos en grado leve (*MRC* 4), mientras que más de la mitad de los pacientes de *La Safor* presentaron afectación de musculatura proximal, en algunos casos en grado moderado-grave. Otro aspecto de interés es que dos pacientes de la familia italo-americana, padre e hijo, desarrollaron una miocardiopatía dilatada a los 32 y 58 años de edad respectivamente. En el presente estudio existe constancia de miocardiopatía dilatada en un paciente, de inicio a los 46 años, mientras que el resto de sujetos evaluados no presentaron signos de implicación miocárdica. Respecto a la patología, únicamente se ha reportado una biopsia en el trabajo de Hedera, obtenida a nivel de cuádriceps, la cual mostró mínima variabilidad del tamaño de fibras con infrecuentes fibras hipotróficas, pero no se detallan otros rasgos característicos descritos en el presente estudio, como son el predominio/hipotrofia de fibras tipo 1, las irregularidades en las tinciones oxidativas y las anomalías mitocondriales.

En este estudio se planteó la posibilidad de que la mutación p.K1729del, hallada en los pacientes de la familia italo-americana y los pacientes de *La Safor*, tuviera un origen común debido a las vinculaciones históricas entre Italia y el Reino de Valencia.

La comarca de *La Safor*, con una población de 183.392 habitantes, se sitúa en el extremo sudoriental de la provincia de Valencia. La actual comarca de *La Safor* está en realidad formada por dos subcomarcas diferenciadas geográfica e históricamente: La Valldigna al norte y *l' Horta de Gandía* o Safor propiamente dicha, al sur, separadas por el macizo montañoso del Montdúver. El término *La Safor* proviene del árabe y etimológicamente hace referencia a la fertilidad de los campos, desde un punto de vista agrícola. Por dicho motivo es lógico que la ocupación humana de estas tierras sea muy antigua, y en la comarca existen numerosos yacimientos prehistóricos entre los que destaca el de la *Cova del Parpalló*.

Por otro lado, esta región se caracteriza por la gran influencia de la cultura islámica, siendo las alquerías musulmanas el origen de la mayoría de las poblaciones actuales. Se calcula que los primeros pobladores musulmanes emigraron al este peninsular en el siglo VIII, produciéndose un proceso de islamización que perduró hasta el siglo XIII⁹².

Entre 1242 y 1243 esta región fue reconquistada por Jaume I a los árabes, aunque la mayoría de la población morisca se sometió a una rendición “voluntaria” aceptando el bautismo y pasando a ser denominados “cristianos nuevos” o moriscos, permaneciendo en la zona hasta el siglo XVII⁹³. En *La Safor* en el siglo XIII había más de 60 alquerías de población musulmana mientras los cristianos se concentraban en núcleos como Gandía, Oliva y Palma y en el *Llibre del Repartiment* sólo se reflejan unos 250 repobladores en esta comarca⁹². Tras la Reconquista, las dos subcomarcas de *La Safor* quedaron integradas en uno u otro de los dos señoríos: La Valldigna pasó a depender del Monasterio Circense de Santa María y Gandía se erigió en ducado. En 1485 el cardenal Rodrigo de Borja, futuro papa Alejandro VI, adquirió el ducado de Gandía a Fernando II “el católico” para cedérselo a su hijo Pedro Luís de Borja. Con posterioridad el ducado de Gandía se fusionó con el condado de Oliva, mediante el matrimonio de Carlos Borja con la heredera del condado de Oliva, Magdalena Centelles⁹⁴.

Durante el siglo XV la Huerta de Gandía presentaba varias peculiaridades. Desde un punto de vista socio-cultural, la población mayoritaria era musulmana, lo cual era excepcional para tratarse de una zona costera y de regadío, a diferencia del resto

del reino, donde los moriscos fueron relegados a vivir en las montañas del interior⁹⁴. Por tanto, alrededor de la ciudad de Gandía, de población mayoritariamente cristiana, existían una multitud de “ràfols” y alquerías moriscas⁹³. La segunda peculiaridad, era que el paisaje agrario venía determinado por el cultivo de una planta exótica, la caña de azúcar (*canyamel*). Finalmente, el tercer rasgo singular, era que la comarca estaba formada por un conjunto de pequeños señoríos.

La población morisca constituía la mano de obra fundamental y otrora más especializada, para el cultivo de la caña de azúcar y así lo fue hasta que se produjo su expulsión en 1609, lo cual supuso un punto de inflexión hacia la decadencia del ducado de Gandía⁹⁴. El primer convoy de galeras salió del puerto de Denia con destino a Orán y transportaba a campesinos de la Huerta de Gandía, los cuales dependían del duque de Gandía, quien era el señor más poderoso del reino⁹³. Existe constancia de que se expulsó aproximadamente 126.000 moriscos valencianos⁹³, lo cual supone un tercio de la población de la época, lo cual viene avalado por la caída de diezmos y rentas señoriales en los años siguientes a la expulsión⁹⁵. En relación a los moriscos del ducado de Gandía, Camarena calcula que se expulsaron unos 12.000⁹². Si bien teóricamente se había indicado que podían permanecer un 6% de los mismos para enseñar y continuar los oficios que desempeñaban, en realidad sólo lo harían los hijos menores de 4 años y de 6 años en el caso de matrimonios mixtos⁹². La proporción de pérdida de habitantes por la expulsión morisca oscila según las fuentes de consulta entre un cuarto (La Parra), un tercio (Ferrer) o la mitad (Camarena)⁹².

Como consecuencia de la expulsión morisca la población valenciana disminuyó ostensiblemente y muchos lugares quedarían deshabitados para siempre⁹⁶. Por tanto, la expulsión de los moriscos derivó en el despoblamiento de la zona y la concesión de Cartas Puebla para el establecimiento de nuevos colonos. Los historiadores opinan que la repoblación del siglo XVII se debió fundamentalmente a movimientos interiores desde los lugares de cristianos viejos a los de moriscos que habían quedado vacíos, lo cual se trató más de una redistribución de la población que de una repoblación propiamente dicha, aunque se calcula que aproximadamente un 5-10% de repobladores fueron extranjeros^{92,97,98}.

En el proceso repoblador del ducado de Gandía destacaron tres características. La primera, la lentitud e inestabilidad de los primeros asentamientos. En segundo lugar, el ya mencionado carácter endógeno, dado que la mayoría de repobladores de *La Safor* procedían de otros lugares del Reino de Valencia, la mayoría próximos. Y la tercera característica y posiblemente la más peculiar de todas es que los contingentes foráneos fueran fundamentalmente mallorquines y genoveses⁹⁶. Este hecho, que puede ser llamativo, se explica por los vínculos de la familia Borja con ambos lugares de origen. Por un lado, el obispo Baltasar de Borja i Fernández de Velasco, hermano del duque de Gandía, acababa de dejar de ser virrey de Mallorca, por lo cual los contactos con la isla debían ser muy estrechos. Por otro lado, el VII duque de Gandía, En Carles Francesc, hizo casar a su único hijo, Francesc Didac Pascual con la hija del almirante Gian Andrea Doria y de Zenòbia Carreto, hija de Andrea Carreto, el titular del marquesado de *Finale*, en Liguria^{96,98}. Precisamente “*del Final*”, como citan las fuentes de esa época, procedían la mayor parte de estos genoveses.

Existe constancia de que los repobladores genoveses se asentaron en Miramar, Benipeixcar, Beniopa y otros lugares de *La Safor*⁹². Los repobladores genoveses se caracterizaron por su comportamiento endogámico, y los casamientos se producían entre parejas italianas de la misma villa o de otras de los alrededores⁹⁶.

Aunque el esfuerzo repoblador fue considerable hasta el punto que en 1646 había más de 2.000 casas habitadas por cristianos frente a las 1.200 de 1609, en el balance poblacional todavía no se alcanzaron los niveles de población hasta el siglo XVIII⁹². Según el censo de *La Safor* de 1646 esta región estaba habitada por unos 8.300 pobladores, cifra notablemente inferior a la del censo de 1510, con 13.600 habitantes⁹². A esta crisis demográfica ocasionada por la expulsión morisca hay que añadir la pérdida de población que se produjo como consecuencia de dos epidemias de peste que azotaron Gandía y otras zonas de la comarca de *La Safor* en la primavera de 1648 y el verano de 1652⁹². Por otro lado, se produjo una notable redistribución geográfica, desapareciendo algunos núcleos urbanos y consolidándose ciudades como Gandía y Oliva como centros urbanos⁹².

Los estudios de haplotipos han descartado un origen común reciente de la mutación al presentar diferentes marcadores flanqueantes los pacientes de *La Safor* con respecto a los de procedencia italiana lo que refleja que se han producido múltiples eventos recombinantes, pero el hecho de que compartan los mismos *SNPs* comprendidos en una pequeña región de 41 kb que abarca la mutación, sugiere un posible origen ancestral común. Una teoría plausible es que las familias de *La Safor* sean descendientes de las familias italianas que repoblaron dicha comarca tras la expulsión de los moriscos en el siglo XVII o que incluso el origen sea mucho más ancestral. Sería necesario realizar una datación formal de la mutación basada en parámetros genéticos o genético/demográficos para estimar cuándo surgió dicha mutación.

Otra hipótesis considerada en este estudio, es que esta región del ADN sea un punto caliente para la aparición de mutaciones. Dicha teoría vendría reforzada por el hecho de que esta mutación en el plano proteico resulta en la delección de un residuo de Lisina, al igual que ocurre con la mutación p.K1617del, punto caliente conocido en relación a la miopatía distal de Laing, descrito en familias de diferentes procedencia geográfica¹⁰. La razón por la cual las mutaciones afectan de manera preferente a los residuos de Lisina puede deberse a que usualmente forman parte de pequeñas secuencias repetidas, las cuales son proclives a perderse durante la meiosis⁹⁹. Sin embargo, el hecho de que estas familias compartan un núcleo haplotípico común apoya que la mutación tiene un origen ancestral común y descarta que se haya originado como evento mutacional independiente en diferentes poblaciones.

FAMILIAS SIN CATALOGAR

Los pacientes pertenecientes a las familias 5, 6 y 7 comparten entre si y en relación a los pacientes de *La Safor* características demográficas, clínicas y en el patrón de afectación muscular determinado por técnicas de imagen.

Como única excepción, destacan ciertas peculiaridades observadas en un paciente de la familia 6, quien de forma superimpuesta a la afectación típica de la musculatura anterior de la pierna presentó una llamativa infiltración grasa de los músculos *gastrocnemius* valorada en los estudios de imagen, músculos característicamente preservados incluso en fases avanzadas de la enfermedad en el resto de pacientes del estudio. En la biopsia muscular de este paciente adicionalmente a otros rasgos comunes al resto de individuos del estudio, se observó un infiltrado inflamatorio endomisial aislado. Pese a estas singularidades todavía consideramos posible que la miopatía que afecta a esta familia se deba a mutaciones en *MYH7* dada la similitud en el fenotipo clínico con los pacientes de las restantes familias del estudio y a que comparte marcadores haplotípicos que engloban el gen *MYH7* con los pacientes de las familias 5 y 7. Sin embargo, debido a que hasta el momento no ha sido posible la identificación de una mutación patogénica en este gen, no podemos descartar la posibilidad de que la miopatía se origine por mutaciones en otros genes diferentes, relacionados o no con el gen *MYH7*.

Tal y como se ha expuesto, la secuenciación de los exones 27 al 40 inclusive del gen *MYH7* en los pacientes pertenecientes a las familias 5, 6 y 7 resultó infructuosa ya que no se ha identificado ninguna mutación. El motivo por el cual el estudio genético se ha centrado en la porción final del gen es porque las mutaciones descritas hasta el momento implicadas en una afectación de la musculatura esquelética preferentemente distal sin miocardiopatía asociada se concentran en esta región. No obstante, no se puede descartar que la causa de la enfermedad en estos pacientes se deba a la existencia de mutaciones en los exones no secuenciados.

Tras la secuenciación de la porción final del gen se decidió modificar la estrategia de estudio y en vez de continuar secuenciando el gen *MYH7* se han puesto en marcha estudios de ADN complementario (cDNA), dado que mediante las técnicas de secuenciación no pueden descartarse fenómenos tipo *splicing*, grandes reordenamientos o la presencia de mutaciones en las regiones reguladoras del gen *MYH7*.

Debemos esperar a los resultados del análisis del cDNA para conocer si los pacientes de las familias no procedentes de *La Safor* presentan mutaciones en el gen *MYH7*.

Es remarcable que en la familia italiana descrita por Scoppetta en 1995⁶⁸, con un patrón clínico compatible con la miopatía distal de Laing, tampoco se encontraron mutaciones en el gen *MYH7* tras la secuenciación de los 40 exones que comprenden dicho gen, a pesar de que mostró evidencia de ligarse a la región *MYH7* en los estudios de ligamiento^{70,10}.

En el presente estudio, si no se confirmaran mutaciones en el gen *MYH7* mediante las técnicas de estudio de mRNA/cDNA, quedaría abierto el diagnóstico hacia otros genes implicados en miopatías con fenotipo distal anterior y patrón de herencia dominante, relacionados o no con el gen *MYH7*.

G. CONCLUSIONES

Del estudio de una serie de pacientes de la *Comunidad Valenciana*, afectados de una miopatía distal de herencia autosómico dominante y que afecta predominantemente a la musculatura del compartimento anterior de la pierna, se concluye que:

1. *La mutación p.K1729del en el gen MYH7 es la causa de la miopatía en los pacientes de las familias de La Safor, lo que los clasifica como miopatía distal de Laing.*
2. *La mutación p.K1729del en los pacientes procedentes de La Safor es una mutación fundadora. Es posible un origen ancestral común de la mutación en las familias de La Safor y la familia de procedencia italiana.*
3. *En los pacientes valencianos no procedentes de La Safor, los estudios de haplotipos mostraron un posible ligamiento con el gen MYH7, aunque todavía no se ha identificado la mutación causal.*
4. *Existe una gran variabilidad fenotípica interindividual en pacientes afectados de miopatía de Laing, tanto a nivel intrafamiliar como interfamiliar.*
5. *Aunque la afectación de la musculatura anterior de la pierna es el rasgo común en la miopatía de Laing, la enfermedad se puede presentar mediante distintos perfiles clínicos incluyendo síndromes escápulo-peroneales o cinturas.*
6. *La miopatía distal de Laing no asocia neuropatía pero puede implicar procesos de remodelación de la unidad motora.*
7. *La afectación del miocardio no es un rasgo común en la miopatía de Laing causada por la mutación p.K1729del, aunque puede asociarse.*
8. *El patrón de afectación muscular en la miopatía distal de Laing evaluado mediante pruebas de imagen es homogéneo y con rasgos diferenciales al descrito en otras miopatías distales.*
9. *Desde un punto de vista patológico, mutaciones en el gen MYH7 deben considerarse en el diagnóstico diferencial de miopatías con cores o multinicores, con desproporción congénita de fibras y miopatías mitocondriales.*

These are the conclusions from the study of a series of patients from the *Comunidad Valenciana* with a distal myopathy characterized by dominant inheritance and preferential involvement of the anterior compartment of the lower legs:

1. *Patients from La Safor families are affected with Laing myopathy caused by the p.K1729del mutation in MYH7 gene.*
2. *The p.K1729del mutation in MYH7 in patients from La Safor indeed is a common founder mutation. A common ancestral origin for the mutation in La Safor and the Italian-American families is possible.*
3. *Haplotypes studies in the patients from outside La Safor region showed a possible linkage of the myopathy with the MYH7 gene, although any mutation has still not been identified.*
4. *There is a wide interindividual variability in the patients with Laing myopathy sharing the p.K1729del mutation, either intrafamilial or interfamilial.*
5. *Although the involvement of the anterior compartment of the lower leg is the hallmark of the disease, Laing myopathy can manifest with a variety of different clinical phenotypes including limb-girdle or scapulo-peroneal syndromes.*
6. *The observation of EMG and pathological findings considered typical of denervation-reinnervation activity in patients with Laing myopathy might be the expression of an abnormal motor unit remodeling process more than to the concurrence of neuropathy.*
7. *The presence of cardiomyopathy is not a common feature of Laing myopathy caused by p.K1729del mutation, although it can be related with.*
8. *The pattern of muscle involvement evaluated by muscle imaging techniques in patients with Laing myopathy is homogeneous and shows striking differences with other distal myopathies.*
9. *MYH7 mutations should be considered in the diagnosis of core/multi-minicore myopathies, congenital fibre type disproportion and mitochondrial myopathies.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Udd B, Griggs RC. Distal myopathies. En: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editores. *Myology*. 3ª edición. New York: McGraw-Hill, 2004: 1169-1185.
2. Saperstein DS, Barohn RJ. Distal Myopathies. En: Bashar Katirji, Henry J. Kaminski, editores. *Neuromuscular Disorders*. 1ª edición. British Library, 2002: 1092-1100.
3. Craig RW, Padron R. Molecular structure of the sarcomere. En: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editores. *Myology*. 3ª edición. New York: McGraw-Hill, 2004: 129-166.
4. Oldfors A. Hereditary myosin myopathies. *Neuromusc Disord* 2007; 17 (5):355-367.
5. Gowers WR. A lecture on myopathy and a distal form. *Br Med J* 1902; 2:89-92.
6. Mastaglia FL, Lamont PJ, Laing NG. Distal myopathies. *Curr Opin Neurol* 2005; 18:504-510.
7. Udd B. Molecular biology of distal muscular dystrophies-Sarcomeric proteins on top. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1772(2):145-58.
8. Saperstein DS, Amato AA, Barohn RJ. Clinical and genetic aspects of distal myopathies. *Muscle Nerve* 2001; 24:1440-50.
9. Laing NG, Laing BA, Meredith C, Wilton SD, Robbins P, Honeyman K et al. Autosomal dominant distal myopathy: linkage to chromosome 14. *Am J Hum Genet* 1995; 56(2):422-427.
10. Meredith C, Herrmann R, Parry C, Liyanage K, Dye DE, Durling HJ et al. Mutations in the slow skeletal muscle fiber myosin heavy chain gene (MYH7) cause Laing early-onset distal myopathy (MPD1). *Am J Hum Genet* 2004; 75(4): 703-708.

- 11.** Mastaglia FL, Phillips BA, Cala LA, Meredith C, Egli S, Akkari PA et al. Early onset chromosome 14-linked distal myopathy (Laing). *Neuromuscul Disord* 2002; 12(4):350-357.
- 12.** Lamont PJ, Udd B, Mastaglia FL, de Visser M, Hedera P, Voit T et al. Laing early onset distal myopathy: slow myosin defect with variable abnormalities on muscle biopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(2):208-215.
- 13.** Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 1999; 8(5):855-861.
- 14.** Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH Jr. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurol* 1999; 53(5):1119-1122.
- 15.** Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998; 20(1):31-36.
- 16.** Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-García R, Palmer J et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001; 49(1):130-134.
- 17.** Illa I, De Luna N, Domínguez-Perles R, Rojas-García R, Paradas C, Palmer J et al. Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 2007; 68(16):1284-1289.
- 18.** Illa I, De Luna N, Gallardo E. Dysferlin muscular dystrophy: clinical heterogeneity and pathogenesis. Presented in the International Symposium on rare diseases, Valencia, Spain, November 16th-18th, 2008.
- 19.** Paradas C, González-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, García-Consuegra I, Gómez H et al. A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord* 2009; 19(1):21-25.

-
- 20.** Klinge L, Dean AF, Kress W, Dixon P, Charlton R, Müller JS et al. Late onset in dysferlinopathy widens the clinical spectrum. *Neuromuscul Disord* 2008; 18(4):288-290.
- 21.** Haravuori H, Mäkela-Bengs P, Udd B, Partanen J, Pulkkinen L, Somer H et al. Assignment of the tibial muscular dystrophy (TMD) locus on chromosome 2q31. *Am J Hum Genet* 1998; 62(3):620-626.
- 22.** Hackman P, Vihola A, Haravouri H, Marchand S, Sarparanta, De Seze J et al. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet* 2002; 71(3):492-500.
- 23.** Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Nonaka I et al. Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 2002; 59(11):1689-1693.
- 24.** Nonaka I, Sunohara N, Ishiura S, Satoyosji E. Familial distal myopathy with rimmed vacuoles and lamellar (myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 1981; 51:141-155.
- 25.** Kayashima T, Matsuo H, Satoh A, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N et al. Nonaka myopathy is caused by mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene (GNE). *J Hum Genet* 2002; 47:77-79.
- 26.** Tomimitsu H, Ishikawa K, Shimizu J, Ohkoshi N, Kanazawa I, Mizusawa H. Distal myopathy with rimmed vacuoles: novel mutations in the GNE gene. *Neurology* 2002; 59(3):451-454.
- 27.** Nonaka I, Sunohara N, Satoyoshi E, Terasawa K, Yonemoto K. Autosomal recessive distal muscular dystrophy: a comparative study with distal myopathy with rimmed vacuole formation. *Ann Neurol* 1985; 17:51-59.

- 28.** Welander L. Myopathia distalis tarda hereditaria. Acta Med Scand 1951; 141 (suppl 265):1-124.
- 29.** Udd B, Bushby K, Nonaka I, Griggs R. Distal myopathies. 104th European Neuromuscular Centre International Workshop, 8-10th March 2002, Naarden, The Netherlands. Neuromuscul Disord 2002; 12:897-904.
- 30.** von Tell D, Somer H, Udd B, Edström L, Borg K, Ahlberg G. Welander distal myopathy outside the Swedish population: phenotype and genotype. Neuromusc Disord 2002; 12(6):544-547.
- 31.** Markesbery WR, Griggs RC, Leach RP, Lapham LW. Late onset hereditary distal-myopathy. Neurology 1974; 24(2):127-134.
- 32.** Haravuori H, Mäkelä-Bengs P, Udd B, Partanen J, Pulkkinen L, Somer H et al. Tibial muscular dystrophy and late onset hereditary distal myopathy are linked to the same locus on chromosome 2q. Neurology 1998; 50 (Suppl. 4): A186.
- 33.** Griggs R, Vihola A, Hackman P, Talvinen K, Haravuori H, Faulkner G et al. Zaspopathy in a large classic late-onset distal myopathy family. Brain 2007; 130:1477-1484.
- 34.** Wallgren-Pettersson C, Lehtokari VL, Kalimo H, Paetau A, Nuutinen E, Hackman P et al. Distal myopathy caused by homozygous missense mutations in the nebulin gene. Brain 2007; 130(Pt 6):1465-1476.
- 35.** Selcen D, Ohno K, Engel AG. Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. Brain 2004; 127: 439-451.
- 36.** Feit H, Silbergleit A, Schneider LB, Gutierrez JA, Fitoussi RP, Reyes C et al. Vocal cord and pharyngeal weakness with autosomal dominant distal myopathy: clinical description and gene localization to 5q31. Am J Hum Genet 1998; 63:1732-1742.

-
- 37.** Senderek J, Garvey SM, Krieger M, Guergueltcheva V, Urtizberea A, Roos A et al. Autosomal-dominant distal myopathy associated with a recurrent missense mutation in the gene encoding the nuclear matrix protein, matrin 3. *Am J Hum Genet* 2009; 84(4):511-518.
- 38.** Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, Hochner H, Chen M, Olender T et al. The UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 2001; 29(1):83-87.
- 39.** Ahlberg G, von Tell D, Borg K, Edström L, Anvret M. Genetic linkage of Welander distal myopathy to chromosome 2p13. *Ann Neurol* 1999; 46(3):399-404.
- 40.** von Tell D, Bruder CE, Anderson LV, Anvret M, Ahlberg G. Refined mapping of the Welander distal myopathy region on chromosome 2p13 positions the new candidate region telomeric of the DYSF locus. *Neurogenetics* 2003; 4(4):173-177.
- 41.** von Tell D. Welander distal myopathy: gene mapping and analysis of candidate genes. Thesis. The Karolinska Institute, Stockholm.2004.
- 42.** Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylen E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurol* 2000; 55(12):1931-1933.
- 43.** Vílchez JJ, Gallano P, Gallardo E, Lasa A, Rojas-García R, Freixas A et al. Identification of a novel founder mutation in the DYSF gene causing clinical variability in the Spanish population. *Arch Neurol* 2005; 62(8):1256-1259.
- 44.** Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown RH Jr. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol* 2002; 51(1):129-133.

45. Daube JR, Rubin DI. Electrodiagnosis of Muscle Disorders. En: Engel AG, Franzini-Armstrong C, editores. *Myology*. 3ª edición. New York: McGraw-Hill, 2004; 619-54.
46. Mahjneh I, Lamminen AE, Udd B, Paetau AE, Hackman P, Korhola OA et al. Muscle magnetic resonance imaging shows distinct diagnosis patterns in Welander and tibial muscular dystrophy. *Acta Neurol Scand* 2004; 110:87-93.
47. Brummer D, Walter MC, Palmbach M, Knirsch U, Karitzky J, Tomczak R et al. Long-term MRI and clinical follow-up of symptomatic and presymptomatic carriers of dysferlin gene mutations. *Acta Myol* 2005; 24(1):6-16.
48. Murakami N, Ihara Y, Nonaka I. Muscle fiber degeneration in distal myopathy with rimmed vacuole formation. *Acta Neuropath* 1995; 89:29-34.
49. Gallardo E, Rojas-García R, de Luna N, Pou A, Brown RH Jr, Illa I. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurol* 2001; 57(11):2136-2138.
50. Selcen D, Stilling G, Engel AG. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurol* 2001; 56(11):1472-1481.
51. Haravuori H, Vihola A, Straub V, Auranen M, Richard I, Marchand S et al. Secondary calpain3 deficiency in 2q linked muscular dystrophy—Titin is the candidate gene. *Neurol* 2001; 56:869–877.
52. Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM, et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurol* 2001 ; 57(2):271-278.
53. Felice KJ, Moore SA. Unusual clinical presentations in patients harboring the facioscapulohumeral dystrophy 4q35 deletion. *Muscle Nerve* 2001; 24:352-356.

-
- 54.** Smestad C, Monstad P, Lindboe CF, Mygland A. Amyloid myopathy presenting with distal atrophic weakness. *Muscle Nerve* 2004; 29(4):605-609.
- 55.** Vlak M, van der Kooi E, Angelini C. Correlation of clinical function and muscle CT scan images in limb-girdle muscular dystrophy. *Neurol Sci* 2000;21(5 Suppl):S975-977.
- 56.** Azorín I, Portoles M, Marín P, Lázaro-Diéguéz F, Megías L, Egea G, Renau-Piqueras J. Prenatal ethanol exposure alters the cytoskeleton and induces glycoprotein microheterogeneity in rat newborn hepatocytes. *Alcohol Alcohol* 2004; 39(3):203-212.
- 57.** Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- 58.** Ferreira A, Ceuterick-de Groote C, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F et al. Desmin-related myopathy with Mallory Body-like inclusions is caused by mutations of the Selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 2004; 55(5):676-686.
- 59.** Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998; 20(1):37-42.
- 60.** Udd B. Distal myopathies. 165th European Neuromuscular Centre (ENMC)-sponsored International Workshop, 6-8th February 2009, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2009; 19:429-438.
- 61.** Hedera P, Petty EM, Bui MR, Blaivas M, Fink JK. The second kindred with autosomal dominant distal myopathy linked to chromosome 14q: genetic and clinical analysis. *Arch Neurol* 2003; 60(9):1321-1325.
- 62.** Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001; 104(4):557-67.

- 63.** Tajsharghi H, Thornell LE, Lindberg C, Lindvall B, Henriksson KG, Oldfors A. Myosin storage myopathy associated with a heterozygous missense mutation in MYH7. *Ann Neurol* 2003; 54(4):495-500.
- 64.** Darin N, Tajsharghi H, Östman-Smith I, Gilljam T, Oldfors A. New skeletal myopathy and cardiomyopathy associated with a missense mutation in MYH7. *Neurology* 2007; 68(23):2041-2042.
- 65.** Overeem S, Schelhaas HJ, Blijham PJ, Grootsholten MI, ter Laak HJ, Timmermans J et al. Symptomatic distal myopathy with cardiomyopathy due to a MYH7 mutation. *Neuromuscul Disord* 2007; 17(6):490-493.
- 66.** Tajsharghi H, Oldfors A, McLeod DP, Swash M. Homozygous mutation in MYH7 in myosin storage myopathy and cardiomyopathy. *Neurology* 2007; 68(12):962.
- 67.** Auer-Grumbach M, John E, Wallefeld W, Fischer C, Speicher M, Laing N. A novel slow-skeletal myosin (MYH7) mutation in a large Australian family presenting as late onset distal myopathy. *Neuromuscul Disord* 2007; 17:883-884.
- 68.** Scoppetta C, Casali C, La Cesa I, Sermoni A, Mercuri B, Pierelli F, Vaccario ML. Infantile autosomal dominant distal myopathy. *Acta Neurol Scand* 1995; 92:122-126.
- 69.** Zimprich F, Djamshidian A, Hainfellner JA, Budka H, Zeitlhofer J. An autosomal dominant early adult-onset distal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2000; 23:1876-1879.
- 70.** Voit T, Kutz P, Leube B, Neuen-Jacob E, Schroder JM, Cavallotti D et al. Autosomal dominant distal myopathy: further evidence of a chromosome 14 locus. *Neuromusc Disord* 2001; 11:11-19.

-
- 71.** Veugelers M, Bressan M, McDermott DA, Weremowicz S, Morton CC, Mabry CC et al. Mutation of perinatal myosin heavy chain associated with a Carney complex variant. *N Eng J Med* 2004; 351:460-469.
- 72.** Toydemir RM, Rutherford A, Whitby FG, Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. Mutations in embryonic myosin heavy chain (MYH3) cause Freeman-Sheldon syndrome and Sheldon-Hall syndrome. *Nat Genet* 2006; 38:561-565.
- 73.** Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurol* 2008; 71(10):758-765.
- 74.** Fischer D, Herasse M, Ferreira A, Barragán-Campos HM, Chiras J, Viollet L et al. Muscle imaging in dominant core myopathies linked or unlinked to the ryanodine receptor 1 gene. *Neurol* 2006; 67:2217-2220.
- 75.** Fananapazir L, Dalakas MC, Cyran F, Cohn G, Epstein ND. Missense mutations in the beta-myosin heavy-chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:3993-3997.
- 76.** Caforio AL, Rossi B, Risaliti R, Siciliano G, Marchetti A, Angelini C et al. Type 1 fiber abnormalities in skeletal muscle of patients with hypertrophic and dilated cardiomyopathy: evidence of subclinical myogenic myopathy. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14:1474-1475.
- 77.** Romero NB, Herasse M, Monnier N, Leroy JP, Fischer D, Ferreira A et al. Clinical and histopathological aspects of central core disease associated and non-associated with RYR1 locus. *Acta Myol* 2005; 24(2):70-73.
- 78.** Laing NG, Clarke NF, Dye DE, Liyanage K, Walker KR, Kobayashi Y et al. Actin mutations are one cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* 2004; 56(5):689-694.

- 79.** Clarke NF, Kolski H, Dye DE, Lim E, Smith RL, Patel R et al. Mutations in TPM3 are a common cause of congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* 2008; 63(3):329-337.
- 80.** Clarke NF, Kidson W, Quijano-Roy S, Estournet B, Ferreiro A, Guicheney P et al. SEPN1: associated with congenital fibre type disproportion. *Ann Neurol* 2006; 59(3):546-552.
- 81.** Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER et al. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J* 2000; 19(9):1963-1973.
- 82.** Mathews KD, Moore SA. Multiminicore myopathy, central core disease, malignant hyperthermia susceptibility, and RYR1 mutations. One disease with many faces? *Arch Neurol* 2004; 61:27-29.
- 83.** Sewry CA, Müller C, Davis M, Dwyer JS, Dove J, Evans G et al. The spectrum of pathology in central core disease. *Neuromusc Disord* 2002; 12(10):930–938.
- 84.** Ferreiro A, Monnier N, Romero NB, LeRoy JP, Bönnemann C, Haenggeli CA et al. A recessive form of central core disease, transiently presenting as multiminicore disease, is associated with a homozygous mutation in the ryanodine receptor type 1 gene. *Ann Neurol* 2002; 51(6):750-759.
- 85.** Ferreiro A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Goemans N, Bönnemann C et al. Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multiminicore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet* 2002; 71:739-749.
- 86.** Jungbluth H, Sewry CA, Brown SC, Nowak KJ, Laing NG, Wallgren-Pettersson C et al. Mild phenotype of nemaline myopathy with sleep

- hypoventilation due to a mutation in the skeletal muscle alpha-actin (ACTA1) gene. *Neuromuscul Disord* 2001; 11(1):35-40.
- 87.** Laing NG, Dye DE, Wallgren-Pettersson C, Richard G, Monnier N, Lillis S et al. Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Hum Mutat* 2009; 30(9):1267-1277.
- 88.** Arbogast S, Beuvin M, Fraysse B, Zhou H, Muntoni F, Ferreiro A. Oxidative stress in SEPN1-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann Neurol* 2009;65:677-686.
- 89.** Jungbluth H, Muntoni F, Ferreiro A. Core Myopathies. 150th European Neuromuscular Centre (ENMC)-sponsored International Workshop held 9-11th March 2007, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2008; 18:989-996.
- 90.** Carmignac V, Salih MA, Quijano-Roy S, Marchand S, Al Rayess MM, Mukhtar MM et al. C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* 2007; 61(4):340–351.
- 91.** Agrawal PB, Greenleaf RS, Tomczak KK, Lehtokari VL, Wallgren-Pettersson C, Wallefeld W et al. Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the CFL2 gene, encoding the skeletal muscle actin-binding protein, cofilin-2. *Am J Hum Genet* 2007; 80(1):162–167.
- 92.** Alonso JE. En: *Història de La Safor*. Primera ed. Simat de la Valldigna: La Xara, 1998: 46-54 y 115-136.
- 93.** Lapeyre H. En: *Géographie de l'Espagne morisque*. 1st ed. Éditions Centre de Recherches Historiques, SEVPEN. Paris, 1959. Editado en español por Publicacions de la Universitat de València, 2009: 33-62.
- 94.** La Parra López S. El nacimiento de un señorío singular: el ducado gandiense de los Borja. *Revista de historia moderna* 2006; 24:31-66.

- 95.** Ardit M. Una reflexión sobre la expulsión de los moriscos valencianos y la repoblación. *Revista de historia moderna* 2009; 27:295-316.
- 96.** La Parra López S. En: *Los Borja y los moriscos: (Repobladores y “terratenientes” en la Huerta de Gandia tras la expulsión de 1609)*. 1st ed. Valencia: Alfons el Magnànim, 1992: 43-95.
- 97.** Reglá J. En: *Estudios sobre los moriscos*. Valencia: Anales de la Universidad de Valencia, 1964: 20.
- 98.** La Parra López S. En: *Historia de Miramar*. Miramar: Ajuntament de Miramar, 2003: 185-187.
- 99.** Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2007; 5(1):7-14.

ANEXO I



HOSPITAL UNIVERSITARIO



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha 28 de febrero de 2008, el Proyecto de Investigación titulado "**Estudio y caracterización clínica, morfológica y molecular de las miopatías distales y en particular de una forma distal anterior de herencia dominante prevalente en valencia**", y se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, en consecuencia este Comité acuerda emitir **informe favorable** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario La Fe por la Dra. N. Muelas del Servicio de Neurología como Investigador Principal.



Fdo: S. Rodríguez
Secretario del CEIB

ANEXO II

PROTOCOLO DE EVALUACIÓN DE MIOPATÍAS DISTALES

Datos de filiación

HC:
 Apellidos:
 Nombre:
 Sexo: 1- hombre 2- mujer
 Fecha de nacimiento:
 Dirección:
 Teléfono:

Patrón de herencia: AD / AR / Ligada al X / Esporádico

Cronología

Primera visita:

Última visita:

Edad de inicio: 1- nacimiento/neonatal
 2- retraso desarrollo psicomotor
 3- de 2-10 años
 4- de 11-20 años
 5- de 21-30 años
 6- de 31-40 años
 7- mayores de 40 años (especificar):

Síntomas

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| 0- asintomático | 1- retracciones/anomalías articulares |
| 2- pie caído | 3- alteración de la marcha |
| 4- mialgias | 5- calambres |
| 6- otros: | |

Progresión

Debilidad inicial:
 a) dorsiflexión de tobillo-punta b)-otros (especificar):

Debilidad posterior:
 a) extensión dedos mano y muñeca b)-proximal en MMII c)-otros (especificar):

Evolución (descriptivo)

.....

Examen motor

Fecha de la exploración:
 Paladar ojival: a) sí b) no
 Facial: /.....
 Cervical: Flexión Extensión
 Tronco:

| | | | | |
|-----------------------|-----------|--------|-------------|---------|
| Escápula alada: Izda: | 0-ausente | 1-leve | 2- moderada | 3-grave |
| Dcha: | 0-ausente | 1-leve | 2- moderada | 3-grave |

Elevación de MMSS por encima de cabeza: a) sí b) no; grado:

| | |
|------------------------------|----------------------------|
| Separación de hombros: | Aproximación: |
| Flexión de codo: | Extensión de codo: |
| Flexión de muñeca: | Extensión de muñeca: |
| Flexión de dedos: | Extensión de dedos: |
| Oposición de pulgar: | Separación dedos: |

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Flexión cadera: | Extensión cadera: |
| Flexión de rodilla: | Extensión rodilla: |
| Flexión de tobillo: | Extensión tobillo: |
| Eversión pie: | Inversión pie: |
| Flexión dedos: | Extensión dedos: |
| Extensión dedo gordo: | Glúteo mayor-menor:..... |

Atrofia: 0-ausente 1-ligera 2-moderada 3-importante

MSD: 0 1 2 3

MSI: 0 1 2 3

MID: muslo anterior / posterior ; pierna antero-externo / posterior

MII: muslo anterior / posterior ; pierna antero-externo/ posterior

Reflejos osteotendinosos:

MSD/MSI

rotulianos

aquíleos

Temblor postural: 0-no 1-sí

Marcha: a)-normal b)-estepaje c)-basculación de cadera d)-hiperlordosis

Maniobra de Gowers: a)- presente b)- ausente

Marcha talones: a)- no b)- sí

Marcha puntillas: a)- no b)- sí

Patrón:

a) distal: anterior posterior global

b) distal-proximal

Sensibilidad

a)- Normal

b)- Alterada (especificar)

.....

.....

Deformidades: 0- ausente 1-ligera 2-moderada 3-importante

Retracción aquilea: 0 1 2 3

Pies cavos: 0 1 2 3

Escoliosis: 0 1 2 3

Otros:

Alteración funcional

0- movilidad normal

2- incapaz de correr

4- andar con bastón

6- deambula con andador

8- encamado

1- leve alteración de la marcha

3- marcha dificultosa pero autónoma

5- andar con muletas

7- silla de ruedas

CPK sérica 0- normal 1- < 500 2- 500-1000 3-> 1000 UI/L

Estudio neurofisiológico

Fecha del estudio:.....

Dr.:

EMG:

0-normal 1- miopático 2- signos de actividad 3- neuropático 4- patrón mixto

Conducciones: 0- normal 1- leve alteración 2- moderada 3- grave

- motoras: 0 1 2 3

- sensitivas: 0 1 2 3

Conclusión: 0- patrón miopático 1- patrón neurógeno 2-patrón mixto

Comentario:.....

.....

.....

.....

Imagen muscular: TC / IRM; 0- normal 1- leve alteración 2- moderada 3-grave

Musculatura axial:

Glúteos:

Muslo: anterior posterior

Pierna: antero-externo posterior

Biopsia a)- sí b)- no

Fecha:

Músculo biopsiado:

Resultado:.....

.....

.....

.....

Genética extraída a)- sí b)- no

ECG. Fecha: a)- normal b)- miocardiopatía

.....

Ecocardiograma. Fecha: a)- normal b)- miocardiopatía

.....

.....

Pruebas funcionales respiratorias: a)- sí b)- no

Grado de afectación respiratoria restrictiva: 1- leve 2- moderada 3-grave

ANEXO III

HOJA INFORMATIVA AL PACIENTE

Para Proyectos de Investigación

TÍTULO DEL ESTUDIO: ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS MIOPATÍAS DISTALES Y EN PARTICULAR DE UNA FORMA DISTAL ANTERIOR DE HERENCIA DOMINANTE PREVALENTE EN VALENCIA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Nuria Muelas Gómez.
Teléfono de contacto: 963862700. Extensión 50130.

CENTRO: Hospital Universitario La Fe (Valencia). Servicio de Neurología

1. INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a Ud. para informarle sobre un estudio de investigación, aprobado por el Comité Ético Asistencial, en el que se le invita a participar.

Nuestra intención es tan sólo que Ud. reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar, si quiere o no participar en este estudio.

Para ello le ruego lea esta hoja informativa con atención, pudiendo consultar con las personas que considere oportuno, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria, y que puede decidir no participar, o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

¿Cuáles son los objetivos de este estudio?

Por medio de este estudio pretendemos profundizar en el conocimiento de esta variedad de miopatía que usted o algún miembro de su familia padece y que afecta predominantemente a la musculatura de la pierna con posterior extensión a otros músculos, tanto desde una vertiente clínica como diagnóstica.

El conocimiento de este grupo de enfermedades musculares ha experimentado un marcado desarrollo en la actualidad. En los últimos 5 años se han descrito nuevas variantes y se han identificado varias mutaciones en los genes responsables de algunas de estas enfermedades. Todo ello ha derivado en importantes avances en relación a aspectos clínicos, genéticos y en el conocimiento de los mecanismos por los cuales se producen estas enfermedades.

Así pues, con este estudio pretendemos conocer mejor el comportamiento clínico de estas enfermedades (forma de presentación, manifestaciones clínicas, evolución, pronóstico, etc) y realizar estudios genéticos para identificar los genes responsables.

¿Qué procedimientos se llevarán a cabo para realizar este estudio?

Para realizar este estudio se requiere de:

- a) Una primera visita, en la que se recogerán sus datos personales y antecedentes de enfermedades tanto personales como familiares. Se le realizará una historia clínica, obteniéndose datos relativos a su enfermedad (molestias que usted padece, edad en la que se iniciaron, tiempo de evolución, etc). También se llevará a cabo una exploración física general y neurológica. En esta visita se procederá a extraer sangre de individuos afectos y sanos pertenecientes a la familia para realizar posteriormente el estudio genético. Previamente a la extracción de sangre, tanto en individuos enfermos como en los familiares que participen en este estudio, se obtendrá el consentimiento informado para la participación en estudios genéticos.
- b) En algunos casos se procederá a la realización de algunas de las siguientes pruebas complementarias adicionales:
 - Análisis de sangre.
 - Electromiograma.
 - Biopsia muscular (se realizará en casos seleccionados para estudiar el músculo con técnicas anatomo-patológicas).
 - Tomografía axial computerizada (TC) o resonancia magnética (RM) muscular.

La mayoría de estas pruebas forman parte del estudio de rutina que habitualmente se practica a los enfermos que padecen una miopatía.

¿Cuántas visitas se realizarán?

A todos los participantes en el estudio se les realizará una primera visita que incluirá la recogida de datos clínicos y una exploración clínica, mediante la cual se determinará si el individuo está afecto o no de la miopatía distal. En el caso de que se trate de un miembro sano, se extraerá sangre para estudios genéticos y no será necesaria la realización de nuevas visitas. En aquellos individuos afectos, se solicitará alguno de los procedimientos anteriormente descritos de cuyos resultados se les informará en una segunda visita y posteriormente se les invitará a proseguir un seguimiento clínico en nuestra consulta. También existe la posibilidad de ser controlado por su especialista de zona, al cual se le facilitarán los conocimientos pertinentes acerca de la enfermedad, su curso, su pronóstico y de la posibilidad de realización de consejo genético.

¿Cuántos pacientes se van a incluir?

Contamos con 5 familias afectas de una miopatía distal con las características propias de la enfermedad objeto del estudio, algunas de ellas con lazos familiares entre si. En total se prevé que participen en el estudio aproximadamente 90 personas y como es una enfermedad autosómica dominante, se calcula que pueda afectar a aproximadamente 30 ó 40 individuos.

4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

¿Cuáles son los beneficios esperados para el paciente y la sociedad?

Este estudio permitirá emitir un diagnóstico preciso del tipo de miopatía distal que usted o sus familiares padecen y el pronóstico de la misma. A su vez servirá para clasificar y conocer mejor este grupo de enfermedades musculares.

En los casos en que existan antecedentes familiares se podrá definir el tipo de herencia y si se conoce el gen causante permitirá emitir consejo genético con el fin de prevenir la aparición de esta enfermedad en generaciones futuras.

¿Cuáles son los riesgos e incomodidades derivados del estudio?

Con respecto a la biopsia de músculo y dado que precisa de la aplicación de anestesia local, esta técnica está contraindicada en caso de que exista alergia a anestésicos locales. Por el riesgo de sangrado local deberá comunicarse si existe alteración en la coagulación de la sangre, de forma constitucional o por la administración de fármacos anticoagulantes (Sintrom) o antiagregantes. Las complicaciones que pueden derivar son poco frecuentes y en general leves (inflamación o infección de la zona de la muestra requiriendo asimismo tratamiento adecuado). Todo ello está reflejado en el formulario del consentimiento de la biopsia muscular, incluido en el listado de Consentimientos Informados de la Conselleria de Sanitat, que el paciente ha de firmar antes de someterse a la biopsia.

En cuanto al estudio genético, se trata de un procedimiento que se realiza con el fin de ayudar al diagnóstico de la enfermedad que usted o alguno de sus familiares padece o pueden padecer en el futuro y realizar así el consejo genético pertinente. La técnica consiste en extraer una muestra de sangre para su análisis, cuyos resultados se le comunicaran a usted exclusivamente y no podrán ser revelados sin autorización. Debido a que el estudio puede extenderse a lo largo de varios años, la muestra ha de conservarse el tiempo necesario en un banco de ADN. Previamente a la extracción de sangre para estudios genéticos deberá firmar el Consentimiento Informado para Estudio Genético, tanto en el caso de que se trate de un sujeto enfermo como si se trata de un sujeto sano miembro de una familia afectada de una miopatía distal.

Con respecto a las otras pruebas solicitadas, son los riesgos e inconvenientes derivados de la práctica clínica habitual en cualquier paciente afecto de una miopatía.

¿Qué ocurre si no deseo participar?

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si no desea participar, tal decisión no va a afectar en ningún modo en la relación que mantiene con su médico ni se va a producir perjuicio en su seguimiento y tratamiento. Incluso si otorga su consentimiento para participar en el estudio, puede decidir retirar su consentimiento en cualquier momento, y su deseo será respetado. Una vez más, si se retira del estudio, tal decisión no afectará a la relación que mantiene con su médico ni producirá perjuicio en su seguimiento y tratamiento.

¿Qué debo hacer si decido participar?

Si decide participar se le pedirá que firme y feche un formulario de consentimiento informado indicando que ha recibido información oral y escrita acerca del estudio, y que muestra su acuerdo para participar libre y voluntariamente en el mismo.

¿Qué ocurre si tengo más preguntas o si hay algo que no entiendo?

Debe sentir total libertad para hablar con su médico en cualquier momento durante el estudio, quién le intentará explicar cualquier asunto que no entienda.

5. CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual se deberá dirigir a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio / colaboradores podrán relacionar dichos datos con Usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones¹, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio / colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país.

En aquellos casos en los que se lleve a cabo la biopsia de músculo, la muestra obtenida será almacenada en el Laboratorio de Investigación Experimental de Neurología (primera planta del Centro de Investigación) y custodiada por el equipo experimental de dicho grupo de investigación (Dr. F. Mayordomo, Dra I. Azorín, Sta L. Gómez). El responsable de la custodia de las muestras de músculo será el Dr. F. Mayordomo. La biopsia se conservará durante el tiempo marcado por la legislación vigente debido a que se trata de una muestra de gran importancia, la cual puede ser determinante en investigaciones futuras en relación al estudio de esta enfermedad y su propietario será el equipo de Investigación Experimental de Neurología.

Toda ésta información se almacenará en una base de datos localizada en el Servicio de Neurología, a la cual podrán acceder los miembros del Grupo de Investigación y Asistencial en la Unidad de Patología Neuromuscular del Servicio de Neurología del Hospital La Fe, siendo el responsable de su custodia el Dr. J. J. Vílchez. Dicha base de datos seguirá las normas establecidas por la Ley Orgánica 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Respecto a los posibles análisis genéticos se realizarán sobre muestras de ADN de forma anónima (codificada) y los resultados descodificados se almacenarán en la base de datos y sólo serán conocidos por sus médicos. Dicha información solamente será transmitida al paciente siguiendo las directrices establecidas por la normativa de este Comité Ético y de Investigación Clínica. Este Comité Ético y de Investigación Clínica entiende que la entrega de este tipo de muestras no tiene carácter de propiedad permanente, que la donación debe estar limitada a unos objetivos claros y concretos, a un tiempo de estudio razonable (no superior a los 6 años) durante el cual el promotor tendrá la oportunidad y ventaja de realizar el estudio sobre dichas muestras con exclusividad y sin competencias; así como desarrollar tantas patentes como pueda y le sean autorizadas. Transcurrido este tiempo:

- Los datos de la información genética derivados del estudio deben ser públicos y/o podrán ser fácilmente consultados.
- El material genómico dejará ser propiedad del promotor y el destino del mismo debe ser decidido y/o regulado por los Organismos Gubernamentales del país de procedencia de las muestras, o en su caso, ser destruido.

El estudio genético de la miopatía distal que usted o alguno de sus familiares padece se va a realizar en colaboración con el grupo de investigación de enfermedades neuromusculares del Folkhälsan Institute of Genetics, dentro del Departamento de Genética Médica de la Universidad de Helsinki, Finlandia. El investigador principal de este grupo es el Dr. B. Udd y su coordinador el Dr. P. Hackman. En el laboratorio de genética de Helsinki se siguen las directrices establecidas por la normativa europea en relación a los análisis genéticos y la confidencialidad de los datos derivados de estos estudios. Por otro lado, se comprometen a utilizar el material genético para intentar identificar la causa genética de este tipo de miopatía distal y no para ningún otro propósito.

6. ESTUDIO CLÍNICO EN MENORES DE EDAD

Le informamos que al tratarse de la participación de su hijo que tiene más de 12 años de edad, se le entregará al mismo una hoja de información y consentimiento informado adaptados a su capacidad de entendimiento, que deberá firmar.

Además, de acuerdo a la legislación vigente, el promotor del estudio ha puesto en conocimiento del Ministerio Fiscal la inclusión de menores de edad en el estudio.

| |
|---|
| MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO |
|---|

Para sujetos adultos y menores maduros (12-18 años)

Yo,.....,

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:

Firma del participante:

**MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA REPRESENTANTE LEGAL**

(Menores de 18 años e incapaces)

Yo,....., en calidad de (relación con el participante)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: (nombre del investigador)

Comprendo que su participación es voluntaria.

Comprendo que puede retirarse del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a (nombre del participante) toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que (nombre del participante) participe en el estudio.

Fecha:

Firma del representante:

MODELO DE NOTIFICACIÓN AL MINISTERIO FISCAL

Inclusión de menores de 18 años e incapaces

Ilmo. Sr. Fiscal Jefe
Audiencia Provincial de Valencia
Plaza de Alfonso el Magnánimo, glorieta
Palacio de Justicia
46071 Valencia

Le informados que en el Hospital Universitario La Fe, se está realizando el proyecto de investigación: “ *Estudio y caracterización clínica, morfológica y molecular de las miopatías distales y en particular de una forma distal anterior de herencia dominante prevalente en Valencia* “, autorizado por el Comité Ético Asistencial, en el cual se prevé la inclusión de menores y/o incapaces.

Valencia a 4 de Mayo de 2007.

Fdo. Dra. Nuria Muelas Gómez.

ANEXO IV

Figura 1a. Pedigrí de la familia 1, formada por cuatro ramas.

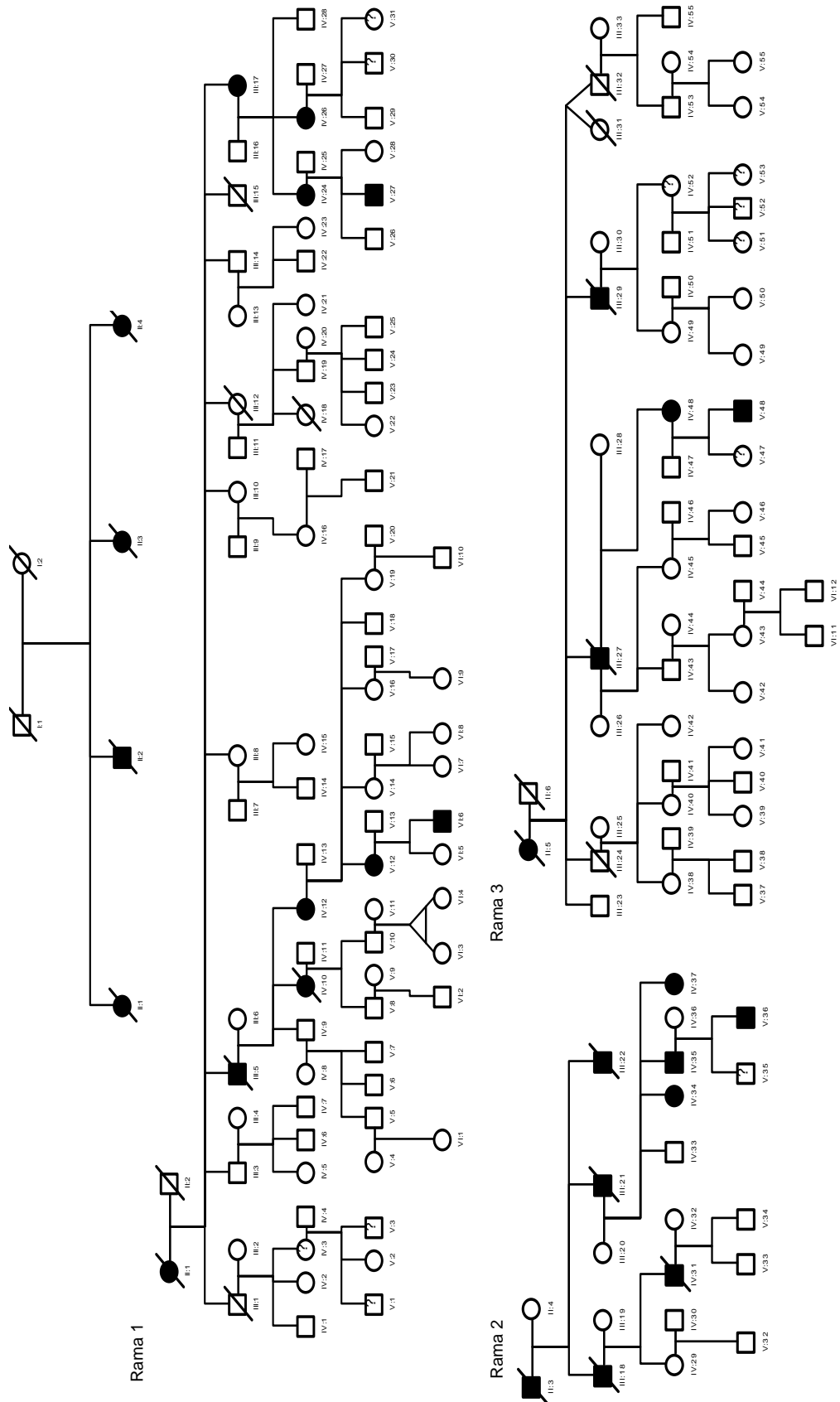
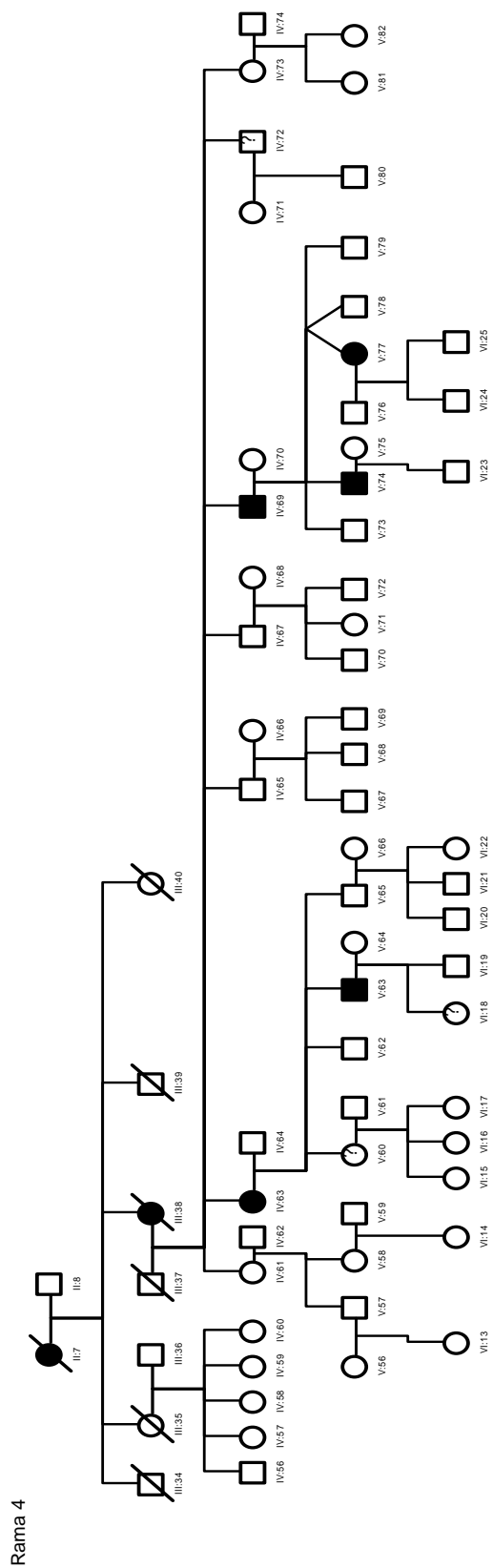


Figura 1b. Pedigrí de la familia 1, formada por cuatro ramas.



Rama 4

Figura 2. Pedigrís de las familias 2, 3 y 4.

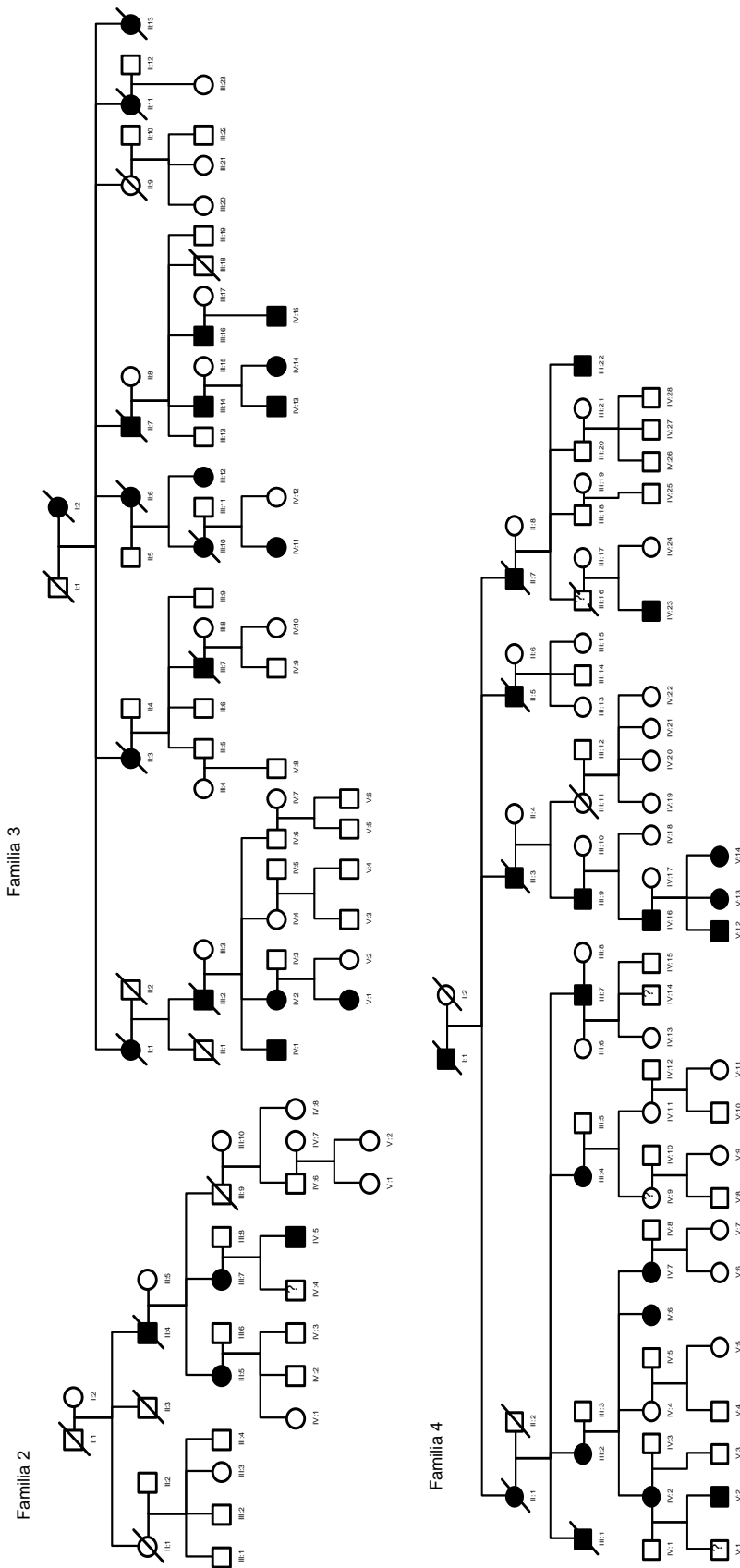
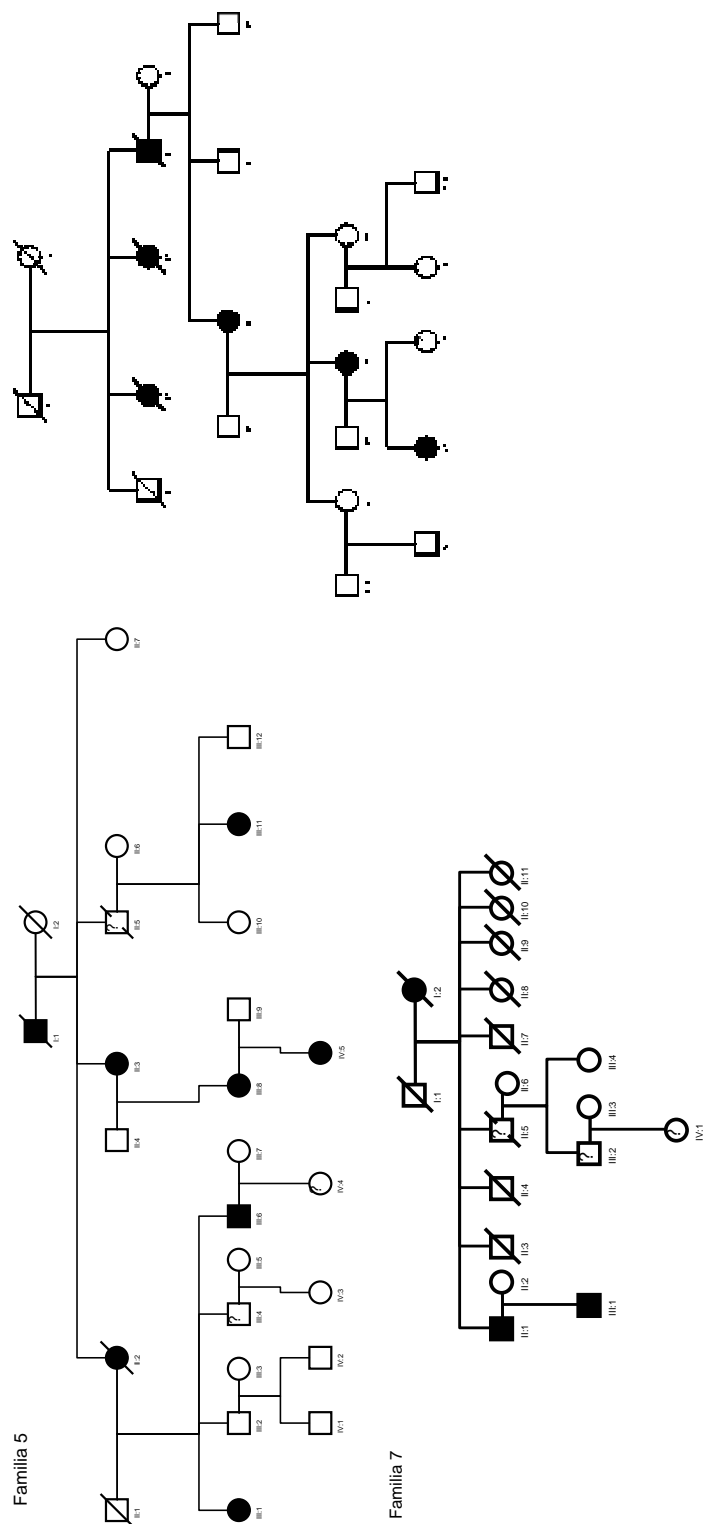


Figura 3. Pedigrís de las familias 5, 6 y 7.



Los cuadrados indican género masculino y los círculos, femenino. Los símbolos en negro indican que el sujeto era afecto y en blanco, no afecto. El signo de interrogación en el centro del símbolo indica que era un individuo clínicamente indeterminado. La línea en diagonal que cruza el símbolo indica que el sujeto ha fallecido.

ANEXO V

CEBADORES

MYH7ex35-36F: TACTCACCCAGAGGGGACTG

MYH7ex35-36R (3'-5'): GAGCTGAAGAAGGAGCAGGA

MYH7ex36F: GCTCAATGCTTTTCCTGCTC

MYH7ex36R (3'-5'): GATGTAAGTCCCCCACTCCA

