Eduardo de Paula Estephan

Estudo clínico e molecular das síndromes miastênicas congênitas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Edmar Zanoteli

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Estephan, Eduardo de Paula
Estudo clínico e molecular das síndromes miastênicas congênitas / Eduardo de Paula Estephan. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientador: Edmar Zanoteli.

Descritores: 1.Síndromes miastênicas congênitas 2.Doenças da junção neuromuscular 3.Junção neuromuscular 4.Receptores nicotínicos 5.Eletromiografia 6.Sequenciamento completo do exoma 7.Brometo de piridostigmina

USP/FM/DBD-300/20

À ***Lys Molina Hernandes Estephan***, quem completa minha alma e faz tudo valer a pena.

E aos ***pacientes***, que são a razão do meu trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a ***Deus***, Quem faz tudo possível.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. ***Edmar Zanoteli***, que me confiou esta tese, o tempo todo me apoiando intelectualmente e provendo ensinamentos não somente técnicos e teóricos, mas também de vida prática, sempre com nenhum pudor em passar tudo o que sabe.

Agradeço ao Prof. Dr. ***Hanns Lochmüller***, por compartilhar seus preciosos conhecimentos e experiência, e por me acolher em Newcastle upon Tyne.

Agradeço a ***Ana Töpf***, que em Newcastle muito me ensinou de prática de interpretação de variantes.

Agradeço ao Dr. ***Antônio Alberto Zambon***, meu exemplo de neurologista, de médico e de pessoa.

Agradeço aos meus ***pais***, ***sogros***, ***esposa***, ***filha***, ***irmão***, ***cunhado***s, ***sobrinhos*** e ***avós***, por serem minha base forte para toda e qualquer empreitada.

Aos Profs. Drs. ***Fernando Kok***, ***Acary Souza Bulle Oliveira*** e ***Carlos Otto Heise***, que ajudaram melhorar esta tese.

Aos ***pacientes***, pela confiança e pela paciência diante de tantos exames,

consultas e esperas.

Agradeço a todas as pessoas que de várias maneiras me ajudaram nesta tese: Prof. Dra. ***Umbertina Reed***, Prof Dr. ***Paulo Marchiori***, Dra. ***Mary Carvalho***, ***Cristiane Moreno***, ***Osório Abath Neto***, ***Rodrigo Mendonça***, ***André Silva, Vitor Caldas***, ***Thaís Freire***, ***Sunitha Balaraju***, ***Eliene Dutra***.

"Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes"

Ricardo Reis

Normatização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências - adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com List of Journals indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Siglas
Lista de Abreviaturas
Lista de Símbolos
Lista de Figuras
Lista de Quadros
Lista de Tabelas
Resumo
Summary

1 Introdução
1.1 A Junção Neuromuscular..... 2
1.2 Eletrofisiologia nas SMC..... 8
1.3 Relação Fenótipo/Genótipo..... 12
1.4 Síndromes Miastênicas Congênitas Pré-Sinápticas..... 14
1.4.1 Síndromes relacionas a mutação no gene CHAT..... 15
1.5 Síndromes Miastênicas Congênitas Sinápticas..... 16
1.5.1. Síndromes relacionas a mutação no gene COLQ..... 17
1.6 Síndromes Miastênicas Congênitas Pós-Sinápticas..... 18
1.6.1 Síndromes relacionas a mutação no gene CHRNE..... 18
1.6.2 Síndromes relacionas a mutação no gene RAPSN..... 19
1.6.3 Síndromes relacionas a mutação no gene DOK7..... 20
1.7 Síndromes Miastênicas Congênitas por Defeitos de Glicosilação..... 20
1.7.1 Síndromes relacionas a mutação no gene GFPT1..... 21
1.8 Síndromes de Canal Lento e de Canal Rápido (Distúrbios de Cinética do AChR)..... 22
1.9 Síndromes Miastênicas no Brasil..... 24
1.10 Justificativa..... 24

2 Objetivos..... 26

3 Pacientes e Métodos
3.1 Pacientes..... 27
3.2 Critérios de Inclusão..... 27
3.3 Critérios de Exclusão..... 28
3.4 Avaliação Clínica..... 28
3.5 Exames Subsidiários..... 28
3.6 Extração de DNA..... 29
3.7 Sequenciamento Direto (SANGER)..... 29
3.8 Sequenciamento de Exoma..... 31
3.9 Análise Estatística..... 35

4 Resultados
4.1 Pesquisa da Mutação c.130dupG no Gene *CHRNE*..... 38
4.2 Pesquisa da Mutação c.1327delG no Gene *CHRNE*..... 40

4.3 Pesquisa da Mutação p.N88K (c.264C>A) no Gene *RAPSN*..... 40
4.4 Pesquisa da Mutação c.1124_1127dupTGCC no Gene *DOK7*.. 41
4.5 Análise de EXOMA..... 42
4.6 Aspectos Clínicos dos Pacientes *CHRNE* Confirmados..... 45
4.7 Aspectos Clínicos dos Pacientes *RAPSN*..... 50
4.8 Aspectos Clínicos dos Pacientes *COL13A1*..... 52
4.9 Aspectos Clínicos dos Pacientes *DOK7*..... 54
4.10 Aspectos Clínicos dos Pacientes *COLQ*..... 56
4.11 Aspectos Clínicos das Pacientes *GFPT1*..... 58
4.12 Aspectos Clínicos da Paciente *GMPPB*..... 61
4.13 Aspectos Clínicos da Paciente *CHAT*..... 63
4.14 Aspectos Clínicos do Paciente *CHRNA1*..... 65
4.15 Aspectos Clínicos do Paciente *SCN4A*..... 67
4.16 Aspectos Clínicos dos Pacientes *CHRNE* Prováveis..... 69
4.17 Aspectos Clínicos do Paciente *RAPSN* Provável..... 74
4.18 Aspectos Clínicos do Paciente *CHRND* Provável..... 76
4.19 Aspectos Clínicos do Paciente *SCN4A* Provável..... 77
4.20 Aspectos Clínicos dos Pacientes não-SMC..... 79
4.21 Aspectos Clínicos dos Pacientes não Diagnosticados..... 87
4.22 Comparação dos Dados Clínicos..... 90

5 Discussão..... 96

6 Conclusões..... 107

7 Anexos..... 109

8 Referências..... 122
Apêndice

Lista de Siglas

3,4-DAP	3,4-diaminopiridina
ABM	Alteração na biópsia muscular
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChR	Receptor de acetilcolina
AMO	Alteração de motricidade ocular
APM	Alteração parcial da motricidade ocular
AT2	Atrofia seletiva tipo II
ATPase	Adenosina trifosfatase
BAM	Do inglês, binary alignment map
BIPMed	Do inglês, Brazilian Initiative on Precision Medicine
CA	Califórnia
ChAT	Acetilcolina transferase
ChT-1	Transportador de captação de colina de alta afinidade
CNP	Curso não progressivo
Colq	Peptídeo da cauda colagênica da acetilcolinesterase
CPK	Creatina fosfoquinase
CPKN	Nível sérico normal de CPK
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dok-7	Proteína de docagem 7
ENMG	Eletroneuromiografia
ER	Estimulação repetitiva
EUA	Estados Unidos da América
ExAC	Do inglês, Exome Aggregation Consortium
FA	Fraqueza apendicular
FF	Fraqueza facial
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FS	Flutuação dos sintomas
gnomAD	Do inglês, Genome Aggregation Database
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HGMD	Do inglês, Human Genome Mutation Database
IP	Início precoce (antes dos 2 anos de idade)
JAFU	Jitter aumentado no estudo de fibra única
JNM	Junção neuromuscular
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LRP4	Proteína 4 relacionada ao receptor de LDL
MA	Massachusetts
ME	Melhora com efedrina
MIT	Do inglês, Massachusetts Institute of Technology
MP	Melhora com piridostigmina
MRC	Do inglês, Medical Research Council
MS	Melhora com salbutamol
MuSK	Tirosina quinase músculo-específica
NCBI	Do inglês, National Center for Biotechnology Information

NGS	Sequenciamento de nova geração, do inglês, new generation sequencing
PA	Potencial de ação
PAMC	Potencial de ação muscular composto
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PRI	Alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior
PT	Ptose palpebral
RDER	Resposta decremental ao estímulo repetitivo
SB	Sintomas bulbares
SD	Sem dados, ou não testado
SMC	Síndromes miastênicas congênitas
SNARE	Complexo solúvel da proteína de ligação ao fator sensível à N-etilmaleimida
Tris	Hidroximetil aminometano
VCF	Do inglês, Variant Call Format

Lista de Abreviaturas

colab.	colaborador(es)
dr.	doutor
drs	Doutores
ed.	edição
et al.	e outros
p.	Página
prof.	professor
v.	volume

Lista de Símbolos

%	porcento
/	Por
<	menor que
=	igual
>	maior que
cm	centímetro
Hz	hertz
Kg	kilograma
Mb	megabite
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
mm^2	milímetro quadrado ms milissegundo
mV	milivolt
N	nitrogênio
n	número
ng	nanograma
nm	nanometro
^oC	graus Celsius
p	probabilidade de significância
pmol	picomol
s	segundo
U	unidade internacional
µL	microlitro
µM	Micromolar
µs	microssegundo

Lista de Figuras

Figura 1	Limiar de placa motora frente a um estímulo repetitivo.....	7
Figura 2	Junção neuromuscular.....	7
Figura 3	Estimulação repetitiva em paciente sem distúrbio de junção neuromuscular (A) e com distúrbio de junção neuromuscular (B), no caso síndrome miastênica congênita por defeito no gene CHRNE.....	11
Figura 4	Representação da unidade motora e do registro dos potenciais de ação de fibras musculares individuais.....	11
Figura 5	Fluxograma das etapas realizadas para diagnóstico molecular.....	35
Figura 6	Gráfico em escalas de cinza mostrando a distribuição das origens dos pacientes incluídos no estudo.....	38
Figura 7	Porcentagem da presença da mutação c.130dupG dentre os casos de SMC CHRNE.....	40
Figura 8	Distribuição dos genes diagnosticados considerando casos índices somente dos confirmados como SMC.....	45
Figura 9	Relativa preservação dos músculos reto inferiores em pacientes com oftalmoparesia parcia.....	50
Figura 10	Aspectos clínicos apresentados por pacientes com mutação homozigótica c.130dupG.....	50
Figura 11	Aspectos clínicos do paciente 31, da família 26.....	52
Figura 12	Preservação relativa da movimentação vertical do olhar nos pacientes 32 (A e B) e 18 (C e D).....	52
Figura 13	Ptose palpebral bilateral nos pacientes 23 (A), 36 (B) e 37 (C).....	54
Figura 14	Achados clínicos de pacientes DOK7.....	56
Figura 15	Relativa preservação dos músculos reto inferiores dos pacientes 29 (A) e 28 (B).....	58
Figura 16	A. Estudo de condução nervosa de nervo ulnar na paciente 29, mostrando duplo potencial após um único estímulo.....	59

Figura 17 Achados clínicos das pacientes GFPT1..... 60

Figura 18 Achados histológicos da biópsia de músculo da paciente 78 da família 67, com mutação no gene GFPT1..... 61

Figura 19 Achados clínicos da paciente 63, da família 54, com mutação no gene GMPPB..... 63

Figura 20 Fotos da paciente 46, da família 38, mostrando traqueostomia (A), ptose palpebral bilateral (B) e malformações dentárias e palato ogival (C)..... 65

Figura 21 Foto do paciente 60 da família 51 evidenciando ptose acentuada e fraqueza facial, além de atrofia proeminente da testa e temporal..... 67

Figura 22 Paciente 16 da família 1..... 68

Figura 23 Pacientes da família 2..... 73

Figura 24 Paciente 70 da família 60..... 75

Figura 25 Paciente 36, da família 31, com ptose palpebral assimétrica (A) e preservação do olhar para baixo (B)..... 77

Figura 26 Alterações fenotípicas do paciente 14, da família 10..... 81

Figura 27 Alterações fenotípicas do paciente 21, da família 17..... 83

Figura 28 Ptose palpebral nos pacientes 25 (A), 51 (B) e 58 (C)..... 86

Figura 29 Porcentagem de alterações eletrofisiológicas típicas de junção neuromuscular (decremento ao estímulo repetitivo ou aumento de jitter) nos 3 grupos de pacientes (SMC confirmados, sem diagnóstico e não-SMC)..... 92

Figura 30 Porcentagem de alterações cognitivas nos 3 grupos de pacientes (SMC confirmados, sem diagnóstico e não-SMC)..... 95

Lista de Quadros

Quadro 1	Genes responsáveis por síndromes miastênicas congênitas e a respectiva localização do defeito genético.	14
Quadro 2	Proporção estimada dos genes relacionados a síndromes miastênicas congênitas.....	14

Lista de Tabelas

Tabela 1	Oligonucleotídeos usados para pesquisa das 4 mutações mais frequentemente descritas nas populações europeia e brasileira.....	30
Tabela 2	Proporção dos genes encontrados no estudo, excluindo-se casos prováveis e casos não-SMC.....	44
Tabela 3	Proporção dos genes encontrados no estudo, considerando casos não-SMC e casos prováveis.....	44
Tabela 4	Principais achados clínicos dos pacientes CHRNE.....	48
Tabela 5	Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes CHRNE.....	49
Tabela 6	Principais achados clínicos dos pacientes RAPSN.....	51
Tabela 7	Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes RAPSN.....	51
Tabela 8	Principais achados clínicos dos pacientes COL13A1.....	53
Tabela 9	Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes COL13A1.....	53
Tabela 10	Principais achados clínicos dos pacientes DOK7.....	55
Tabela 11	Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes DOK7.....	55
Tabela 12	Principais achados clínicos dos pacientes COLQ.....	57
Tabela 13	Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes COLQ.....	57
Tabela 14	Principais achados clínicos dos pacientes GFPT1.....	59
Tabela 15	Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes GFPT1.....	59
Tabela 16	Principais achados clínicos de pacientes SMC.....	68
Tabela 17	Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos de pacientes SMC.....	69
Tabela 18	Principais achados clínicos de pacientes classificados	

como provável SMC..... 78

Tabela 19 Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos de pacientes provável SMC..... 79

Tabela 20 Principais achados clínicos de pacientes não-SMC..... 86

Tabela 21 Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos de pacientes não-SMC..... 87

Tabela 22 Principais achados clínicos dos pacientes sem diagnóstico..... 89

Tabela 23 Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes sem diagnóstico..... 89

Tabela 24. Comparação dos aspectos clínicos entre os grupos com e sem diagnóstico molecular de SMC..... 94

Resumo

Estephan EP. *Estudo clínico e molecular das síndromes miastênicas congênitas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Síndromes miastênicas congênitas (SMC) constituem um grupo raro de doenças genéticas com fenótipo muitas vezes difícil de distinguir clinicamente entre elas. Há ainda sobreposição de aspectos clínicos de SMC com algumas miopatias. Dessa forma, uma melhor caracterização clínica das diferentes formas de SMC seria de grande importância. O presente estudo teve os seguintes objetivos: 1) caracterizar clinicamente os pacientes com SMC em nosso meio; 2) identificar mutações mais frequentes em genes que causam SMC em nosso meio; 3) correlacionar as mutações encontradas com o quadro clínico dos pacientes. Assim, foram analisadas características clínicas, histológicas e eletrofisiológicas de uma coorte de 79 pacientes (57% mulheres) com suspeita de SMC um serviço terciário no Brasil. Estes pacientes eram de 68 famílias não relacionadas, com idades entre 1 e 69 anos (média: 26,7). As características clínicas observadas foram correlacionadas com o diagnóstico molecular final. Foram coletados dados de avaliações clínicas e exames auxiliares e amostras de sangue foram submetidas a testes moleculares, incluindo sequenciamento de nova geração, tal qual exoma, para aqueles não diagnosticados por sequenciamento Sanger de regiões estratégicas dos principais genes. Após análise molecular, os casos foram estratificados em quatro categorias: diagnóstico confirmado de SMC (51 pacientes), diagnóstico de condição não-SMC (cinco pacientes), diagnóstico provável de SMC (sete pacientes) e casos não resolvidos (16 pacientes). Os achados clínicos foram comparados entre o grupo com diagnóstico molecular confirmado de SMC e os grupos: não resolvido e não-SMC. Pacientes classificados como prováveis SMC foram excluídos da comparação. *CHRNE* foi o gene afetado em 22 famílias, seguido por *RAPSN* (n=5), *COL13A1* (n=3), *DOK7* (n=3), *COLQ* (n=2), *GFPT1* (n=2), *SCN4A* (n=1), *CHAT* (n=1), *CHRNA1* (n=1) e *GMPPB* (n=1). Foram significativamente mais frequentes nos casos confirmados de SMC: presença de história familiar; alterações motoras na primeira infância; presença de fraqueza de membros,

fraqueza facial, fraqueza mastigatória, crises miastênicas frequentes, alterações eletrofisiológicas do defeito da junção neuromuscular e alterações miopáticas leves na biópsia muscular. Nenhum caso com sintomas exclusivamente oculares foi confirmado como SMC, o que também foi estatisticamente significante. Em contraste, nos casos não-SMC, a deficiência intelectual foi significativamente mais frequente e as alterações eletrofisiológicas menos frequentes. Concluímos que *CHRNE* foi o principal gene envolvido, e mutações em *RAPSN* foram relevantes em nossa população. A pesquisa de mutações comuns nos 3 genes mais relacionados a SMC (c.130dupG em *CHRNE*, p.N88K em *RAPSN* e c.1124_1127dupTGCC em *DOK7*) pode levar a um diagnóstico molecular de mais de 60% dos casos. Provavelmente há casos de CMS relacionados a genes ainda não descritos em nossa população, ou pode haver contribuição significativa de mutações intrônicas, ou grandes deleções/duplicações na etiologia de SMC, visto que cerca de 20% dos casos não foram solucionados. Algumas características clínicas, e principalmente alterações eletrofisiológicas típicas são capazes de predizer o diagnóstico molecular de SMC. Além disso, alterações miopáticas também podem ser uma característica frequente.

Descritores: Síndromes miastênicas congênitas; Doenças da junção neuromuscular; Junção neuromuscular; Receptores nicotínicos; Eletromiografia; Sequenciamento completo do exoma; Brometo de piridostigmina.

Summary

Estephan EP. *Congenital myasthenic syndromes*: clinical and molecular aspects [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Congenital myasthenic syndromes (CMS) comprise a rare group of genetic diseases with phenotype that can be difficult to be distinguished between their selves. Yet, overlap with clinical aspects of some myopathies is seen. Thus, more precise mapping of clinical features to final diagnosis is valuable to improve this situation. This study had the following objectives: 1) to characterize clinically patients with CMS in our environment; 2) to identify more frequent mutations in genes that cause CMS in our environment 3) to correlate the mutations found with the clinical condition of patients. The clinical, histological and electrophysiological characteristics of a large cohort of 79 patients (57% female) with suspected CMS from a tertiary center in Brazil were analyzed. They were from 68 unrelated families, and age varied from 1 to 68 years (mean: 26.7). Observed features were correlated with the final molecular diagnosis. Data from clinical evaluations and ancillary exams were collected and blood samples were submitted to molecular tests, which included new generation sequencing, like whole exome sequencing, for those not diagnosed by Sanger sequencing of hotspots of the main genes. Cases were stratified into four categories: confirmed diagnosis of CMS (51 cases), confirmed diagnosis of other condition (non-CMS) (five cases), probable diagnosis of CMS (seven cases), and unsolved cases (16 cases). Clinical findings were compared between the group with a confirmed molecular diagnosis of CMS and the groups: unsolved and non-CMS. Patients classified as probable were excluded from the comparison. *CHRNE* was the defective gene in 22 families, and was followed by *RAPSN* (n=5), *COL13A1* (n=3), *DOK7* (n=3), *COLQ* (n=2), *GFPT1* (n=2), *SCN4A* (n=1), *CHAT* (n=1), *CHRNA1* (n=1), and *GMPPB* (n=1). Were significantly more frequent in CMS confirmed cases the presence of: family history; early infancy clinical features; limb weakness, facial weakness, masticatory weakness, frequent myasthenic crisis, electrophysiological alterations of neuromuscular junction defect and mild myopathic alterations on muscle biopsy. No cases with exclusive ocular

symptoms were confirmed as CMS, which was also statistically significant. In contrast, in non-CMS cases, intellectual disability was significantly more frequent, and electrophysiology alterations less frequent. In conclusion, *CHRNE* was the main gene involved in CMS, and mutations in the *RAPSN* gene were relevant in our population. Search for common mutations in the 3 genes most frequently related to CMS (c.130dupG in *CHRNE*, p.N88K in *RAPSN*, and c.1124_1127dupTGCC in *DOK7*) could lead to a molecular diagnosis of more than 60% of cases. There are probably cases of CMS related to genes not yet described in our population, or may be significant contribution of intronic mutations or major deletions/duplications in the etiology of CMS since approximately 20% of cases were unable to reach a diagnosis. Some clinical features, and especially typical electrophysiological changes, are able to predict the molecular diagnosis of SMC. In addition, myopathic changes can also be a frequent feature.

Descriptors: Myasthenic syndromes, congenital; Neuromuscular junction diseases; Neuromuscular junction; Receptors, nicotinic; Electromyography; Whole exome sequencing; Pyridostigmine bromide.

1 Introdução

Síndromes miastênicas congênitas (SMC) são definidas como o conjunto de síndromes causadas por alterações genéticas que levam a comprometimento do fator de segurança da junção neuromuscular. Fator de segurança (ou margem de segurança) se refere a “voltagem extra” do potencial da placa motora, após um estímulo comum do nervo motor. Essa voltagem seria “extra” porque é acima do limiar necessário para induzir a despolarização da fibra muscular. Isso garante uma segurança da transmissão neuromuscular, de forma que caso a voltagem do potencial diminua um pouco, ainda ficará acima do limiar, e a transmissão acontecerá, ou seja, a membrana da fibra muscular (sarcolema) será despolarizada[1].

Em algumas condições fisiológicas é esperado uma pequena queda do potencial na sinapse. O principal exemplo é após um estímulo repetitivo, ou, clinicamente, após um esforço físico. Nesses casos, geralmente a transmissão é garantida, pois a queda na voltagem do potencial é menor que o fator de segurança. Ou seja, ainda se atinge o limiar para transmissão, mesmo que o potencial da placa seja menor que o usual. No entanto, nas síndromes miastênicas em geral (incluindo SMC), como há comprometimento do fator de segurança, após um estímulo repetitivo o potencial pode cair abaixo do limiar, e não ser eficaz para despolarizar a membrana muscular (Figura 1). Dessa forma a doença se expressará clinicamente por fraqueza após o uso repetido de um grupo muscular, ou o que geralmente chamamos de fatigabilidade.

1.1 A Junção Neuromuscular

A junção neuromuscular (JNM) (placa motora, no jargão eletrofisiológico) é uma sinapse especializada entre um neurônio motor e uma fibra muscular[2]. Didaticamente é dividida em três partes: a membrana pré-sináptica (parte terminal da membrana do neurônio motor), o espaço sináptico e a membrana pós-sináptica (membrana plasmática da fibra muscular, ou sarcolema). Há uma série de proteínas e complexos proteicos envolvidos na maturação e manutenção da junção neuromuscular, sendo que a precisa distribuição dos receptores e canais específicos é fundamental para o perfeito funcionamento da junção[3].

No citoplasma do nervo terminal a enzima ChAT (acetilcolina transferase) adiciona um grupo acetila à colina, produzindo a acetilcolina. Moléculas de acetilcolina são agrupadas em vesículas e armazenadas em três compartimentos de vesículas sinápticas funcionalmente distintos[4]:

1) compartimento de vesículas de rápida liberação (1 a 2% de todas as vesículas sinápticas no nervo terminal), que compreende o menor dos compartimentos, formado por vesículas sinápticas preparadas para liberação na fenda sináptica e em contato físico com a membrana pré-sináptica, localizada na chamada zona ativa e que fazem exocitose imediatamente após a chegada do estímulo nervoso, sendo recicladas em poucos segundos;

2) compartimento de vesículas de reciclagem, responsável por 10 a 20% de todas as vesículas sinápticas no terminal nervoso, que fazem exocitose após alguns segundos de estímulo continuado e são recicladas também dentro de alguns segundos;

3) grupo de vesículas de reserva, que inclui 80 a 90% de todas as vesículas sinápticas no terminal nervoso - essas vesículas fazem exocitose somente após a estimulação que dura dezenas de segundos ou minutos, e são recicladas lentamente ao longo de vários minutos.

Embora esses três grupos de vesículas sejam funcionalmente distintos, apenas as vesículas de rápida liberação têm lócus anatômico determinado nas zonas ativas; as outras são encontradas acima das zonas ativas e nas partes mais profundas do nervo terminal[4]. Essas vesículas de rápida liberação são vesículas do grupo de reciclagem e de reserva que se deslocaram para a zona ativa através da interação de pelo menos 3 estruturas: a sinaptotagmina vesicular com a neurexina da membrana pré-sináptica e o canal de cálcio-voltagem dependente[5-7]. Filamentos de actina e miosina desempenham um papel nesse movimento, provavelmente com filamentos de actina servindo de trilhas para as vesículas se deslocarem usando ”motores” de miosina[8,9]. As vesículas sinápticas se fundem com a membrana celular do neurônio pré-sináptico em um processo mediado pelo complexo solúvel da proteína de ligação ao fator sensível à N-etilmaleimida (SNARE), que são uma grande família de proteínas que consiste em pelo menos 60 membros em células de mamíferos. O papel principal das proteínas SNARE é mediar a fusão das vesículas[10]. A fusão resulta no esvaziamento do conteúdo da vesícula de 7.000-10.000 moléculas de acetilcolina na fenda sináptica, um processo conhecido como exocitose. Consequentemente, a exocitose libera acetilcolina em pacotes chamados quanta[11].

Na presença de estímulo elétrico do potencial de ação do nervo motor, os canais de cálcio voltagem-dependente da membrana do nervo motor terminal se

abrem, permitindo a entrada de cálcio. O cálcio induz a fusão das vesículas de acetilcolina na membrana, com consequente liberação de acetilcolina na fenda sináptica, ou espaço sináptico. A fenda sináptica é um espaço pequeno, de aproximadamente 100 nm de largura, que separa a membrana pré-sináptica da membrana pós-sináptica, e é aonde as moléculas de acetilcolina se difundem para a membrana pós-sináptica para se ligarem ao seu receptor (receptor de acetilcolina – AChR). É também nesse espaço que se encontra a acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável por degradar rapidamente (em menos de 1ms) a acetilcolina. Sua função é muito importante por principalmente dois motivos: 1) evita que a ligação da acetilcolina com o AChR seja muito prolongada, o que alteraria muito o potencial da membrana pós-sináptica, atrapalhando as despolarizações subsequentes e induzindo lesão e desorganização da membrana; 2) permite a rápida reabsorção dos grupos colina pelo nervo motor terminal, mantendo abundante essa matéria-prima para produção de nova acetilcolina. A AChE então, rapidamente “limpa” os AChR, deixando-os prontos para o próximo estímulo. Duas classes de AChE estão presentes no músculo esquelético de mamíferos: 1) formas globulares que consistem em monômeros, dímeros ou tetrâmeros da isoforma T da subunidade catalítica e 2) formas heteroméricas que consistem em subunidades da isoforma T da subunidade catalítica ligadas a uma subunidade tripla helicoidal semelhante à cauda de colágeno (formas assimétricas) ou a subunidades hidrofóbicas[12]. Ainda considerando mamíferos, a AChE assimétrica, ligada à cauda semelhante a de colágeno, está concentrada na junção neuromuscular, onde é o tipo predominante de AChE[13]. A cauda é formada pela associação helicoidal tripla de três cadeias semelhantes ao colágeno, e é codificada pelo gene *COLQ*[14]. Há

nela um domínio de ligação rico em prolina, onde cada cadeia pode ligar-se a um tetrâmero da isoforma T da subunidade catalítica da AChE[15]. A função da cauda semelhante ao colágeno é ancorar as subunidades catalíticas na lâmina basal, mantendo-as estáveis, e localizadas em pontos estratégicos[14].

Na membrana pós-sináptica, encontram-se os AChRs, e os canais de sódio voltagem-dependente. A membrana apresenta diversas dobras, as quais levam a formação de cristas e vales, sendo as cristas mais próximas da membrana pré-sináptica (membrana do neurônio motor terminal). Para um perfeito funcionamento da transmissão, os AChRs devem se localizar nas cristas, estrategicamente agrupados, de forma que fiquem mais próximos dos locais de liberação de acetilcolina. Já os canais de sódio voltagem-dependente são alocados preferencialmente na profundidade das dobras, o que é conveniente para melhorar a dispersão da despolarização[16]. Essa específica disposição dos AChRs e canais de sódio garantem um fator de segurança duas a quatro vezes maior[1]. Para manutenção da membrana pós-sináptica, inclusive com o adequado agrupamento de AChRs, é necessário a interação de diversas proteínas, tendo o nervo terminal um papel importante para isso. O principal mecanismo de manutenção é o mediado pela secreção de agrina pelo nervo terminal. A agrina interage com um complexo proteico formado por MuSK (tirosina quinase músculo-específica) e a LRP4 (proteína 4 relacionada ao receptor de LDL) ativando esse complexo[17]. MuSK-LRP4 ativados fazem a fosforilação da Dok-7 (proteína de ancoragem 7), que por sua vez interage com a rapsina, a qual se encontra geralmente ligada ao AChR[18]. A interação entre Dok-7 ativada e a rapsina ligada ao AChR garante a adequada distribuição dos AChR (agrupados nas cristas das membranas). Essas interações,

principalmente entre MusK, Dok-7, rapsina e LRP4 são também fundamentais para diferenciação do aparato pós-sináptico durante a formação da junção neuromuscular[18].

O AChR é um canal catiônico transmembrana, e quando duas moléculas de acetilcolina se ligam a ele, sua comporta se abre e permite a entrada de cátions, principalmente sódio, alterando o potencial da membrana pós-sináptica (também chamado de potencial da placa motora, ou potencial de placa terminal). Se isso ocorre em número suficiente de receptores, o potencial da membrana atinge o limiar necessário para induzir a abertura dos canais de sódio voltagem-dependente (o limiar do qual foi comentado anteriormente para explicar o fator de segurança). Com a abertura dos canais de sódio, o potencial se propaga pela fibra, atingindo a rede de túbulos-T da fibra muscular, despolarizando assim a porção interna da fibra muscular. A despolarização das porções internas ativa os receptores de rianodina (via interação com receptor de diidropiridina) no retículo sarcoplasmático adjacente. O receptor de rianodina funciona como um canal de cálcio voltagem-dependente, e quando ativado permite que o cálcio seja liberado do retículo sarcoplasmático para se difundir por todo o sarcoplasma, o que no final induz a contração da fibra muscular[19].

Mutações em genes que codificam qualquer das proteínas citadas anteriormente podem levar a alteração do funcionamento da junção neuromuscular, causando alteração do fator de segurança, e, portanto, SMC[20]. Na verdade, foram expostas aqui apenas as principais proteínas envolvidas, mas hoje já existem mais de 30 genes descritos como causadores de SMC[21]. A Figura 2 mostra esquematicamente a junção neuromuscular com as proteínas mais importantes relacionadas, de forma simplificada.

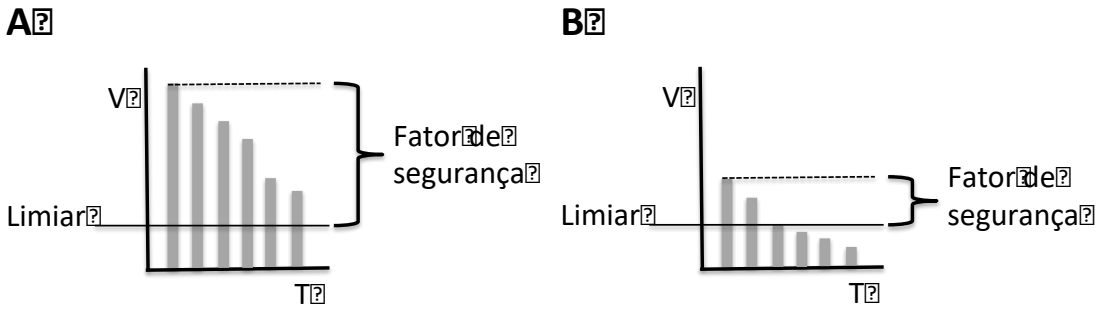

Figura 1 - Limiar de placa motora frente a um estímulo repetitivo. A. Estímulo repetitivo em placa motora normal, mostrando queda do potencial após alguns estímulos, porém mantendo o potencial sempre acima do limiar. B. Estímulo repetitivo em placa motora nas síndromes miastênicas congênitas, mostrando um potencial menor já nos primeiros estímulos, com uma distância menor do limiar (menor fator de segurança). Após alguns estímulos há uma queda do potencial da placa, levando o estímulo para valores menores que o limiar

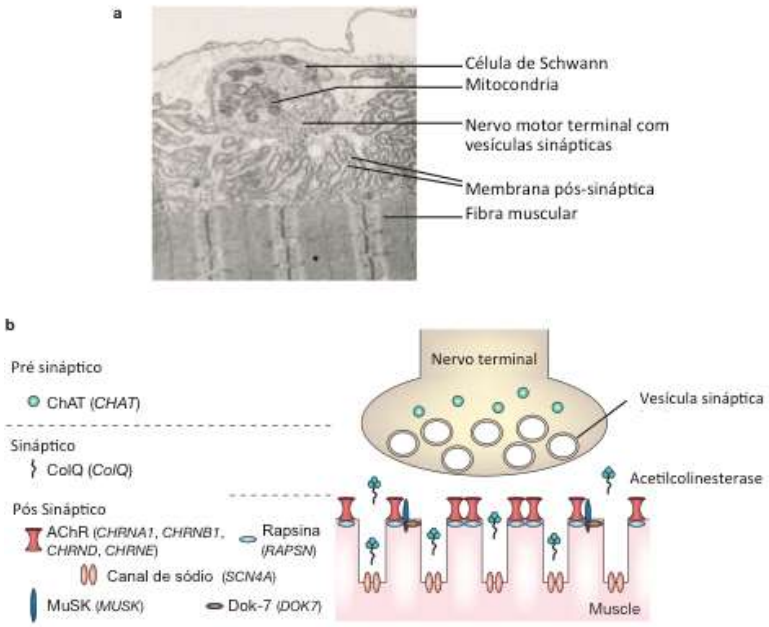

Figura 2 - Junção neuromuscular. A. Microscopia eletrônica mostrando a junção neuromuscular e sua principais estruturas. B. Esquema ilustrando a localização das principais proteínas envolvidas nas síndromes miastênicas congênitas. Entre parênteses estão indicadas as siglas dos respectivos genes. Figura modificada de Muller JS et al[22] (autorizada a reprodução por Cambridge University Press)

1.2 Eletrofisiologia nas SMC

O estudo neurofisiológico mais simples e rotineiramente utilizado para avaliar a junção neuromuscular em pacientes com suspeita clínica de SMC é a estimulação repetitiva (ER) (Figura 3). A técnica faz parte da eletroneuromiografia convencional e consiste na aplicação de estímulos elétricos supramáximos, sequenciados e de frequência baixa (3Hz) sobre o nervo. A presença de decremento anormal (>10%), ou seja, uma queda da amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC) entre o primeiro e o quarto potencial evocado é indicativa de um distúrbio pós-sináptico da JNM[23]. Dessa forma, nos pacientes com alterações na junção neuromuscular o estímulo repetitivo resulta em potenciais de ação variáveis, geralmente diminuindo após alguns estímulos. Quando essa diminuição, ou decremento, é maior que 10% entre o primeiro e o quarto estímulo, o exame é considerado positivo para distúrbios de placa[24]. A técnica não requer treinamento especifico, porém sua sensibilidade para o diagnóstico de distúrbios de junção neuromuscular é relativamente baixa nas formas puramente oculares, variando de 10% a 17% em casos de miastenia gravis autoimune forma ocular, por exemplo[25]. Em alguns subtipos de SMC em que o defeito primário resulta em comprometimento da liberação de acetilcolina (ACh) (genes *SYT2*, *MUNC18-1 ou SNAP25B)*, o estímulo repetitivo realizado em alta frequência por um período prolongado (por exemplo, 10Hz por 5 minutos) resulta em um efeito oposto e observa-se um incremento na amplitude dos potenciais de ação, semelhante ao que acontece na síndrome de Lambert-Eaton. Já em alguns outros subtipos de SMC pré-sinápticos em que o defeito não está prejudicando a liberação de ACh, mas sim sua síntese no terminal do nervo pré-sináptico (por exemplo, nas mutações no

CHAT ou VAMP1), muitas vezes não é detectada nenhuma alteração até que o grupo de vesículas de liberação rápida e o grupo de vesículas de reserva sejam esgotados. Em tais casos, o estímulo repetitivo de alta frequência prolongada (por exemplo, 10Hz por 5 minutos) é necessário para se verificar o prejuízo no grupo de vesículas de reserva (discutido na sessão anterior), e assim garantir que o diagnóstico não seja negligenciado[26]. Em geral, o teste de estímulo repetitivo, no entanto, não é considerado de boa sensibilidade, já que é necessária uma falha completa da placa motora para que vejamos a alteração.

O estudo de fibra única é um teste mais sensível e pode detectar defeitos mais leves de transmissão neuromuscular, pois mede a variabilidade (ou "jitter") do tempo necessário para excitar a fibra muscular. Trata-se de um método para registro de potenciais de ação (PAs) de uma única fibra muscular em músculos ativados voluntariamente. Ao se registrar duas fibras musculares pertencentes à mesma unidade motora, percebe-se uma variabilidade no intervalo de tempo entre os dois PAs (em músculos normais, em torno de 25μs), o qual é denominado *jitter*[27,28] (Figura 4). O fenômeno do jitter tem origem, principalmente na JNM, e é causado pela variabilidade no tempo de transmissão neuromuscular na placa motora terminal[29,30]. Assim, o aumento de jitter no estudo de fibra única faz-se sensível para distúrbios da JNM. Quando normal em um músculo fraco, esse estudo pode praticamente excluir o diagnóstico de um defeito de junção neuromuscular como causa da fraqueza. No entanto, não é um teste específico para a disfunção da junção neuromuscular, pois o aumento do *jitter* pode ser encontrado nos estágios iniciais de re-inervação e em miopatias, e ainda pode aumentar de acordo com a idade[24].

A agulha específica para realizar exame de fibra única consiste em um fio de 25μm de diâmetro dentro de uma cânula, com uma área de registro muito seletiva, que permite o registro de fibras musculares individuais[31]. Devido ao alto custo das agulhas de fibra única, e à necessidade de utilização de material descartável em procedimentos médicos, tem-se cada vez mais usado para análise de jitter a agulha concêntrica como alternativa à agulha de fibra única. A agulha concêntrica apresenta área de registro menor que as agulhas monopolares, embora ainda muito maior que a agulha de fibra única. Atualmente é sugerido que se utilize o termo “análise do jitter com agulha concêntrica” quando o estudo é realizado com tal agulha e não a agulha de fibra única[32]. No presente estudo, todas as análises de jitter foram realizados com agulha concêntrica, e os termos “análise do jitter com agulha concêntrica” e “estudo de fibra única” são utilizados como sinônimos.

Um achado mais específico na eletroneuromiografia convencional, embora muito pouco sensível, é o duplo potencial, causado pela geração de um segundo potencial de ação muscular composto, seguindo apenas uma estimulação do nervo motor. Esta alteração é característica da SMC de canal lento e de defeitos no gene *COLQ*, ambos levando a inativação retardada dos AChRs, após sua ligação da ACh.

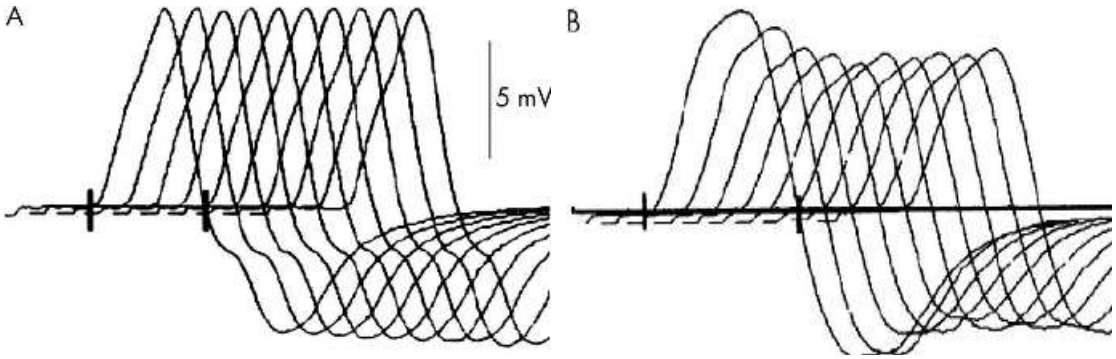

Figura 3 - Estimulação repetitiva em paciente sem distúrbio de junção neuromuscular (A) e com distúrbio de junção neuromuscular (B), no caso síndrome miastênica congênita por defeito no gene *CHRNE*. Em A vê-se uniformidade do tamanho dos potenciais de ação musculares compostos, enquanto em B há decremento maior que 10% dos potenciais, sendo o pico da redução no 5º estímulo (tipicamente entre o 4º e o 7º)

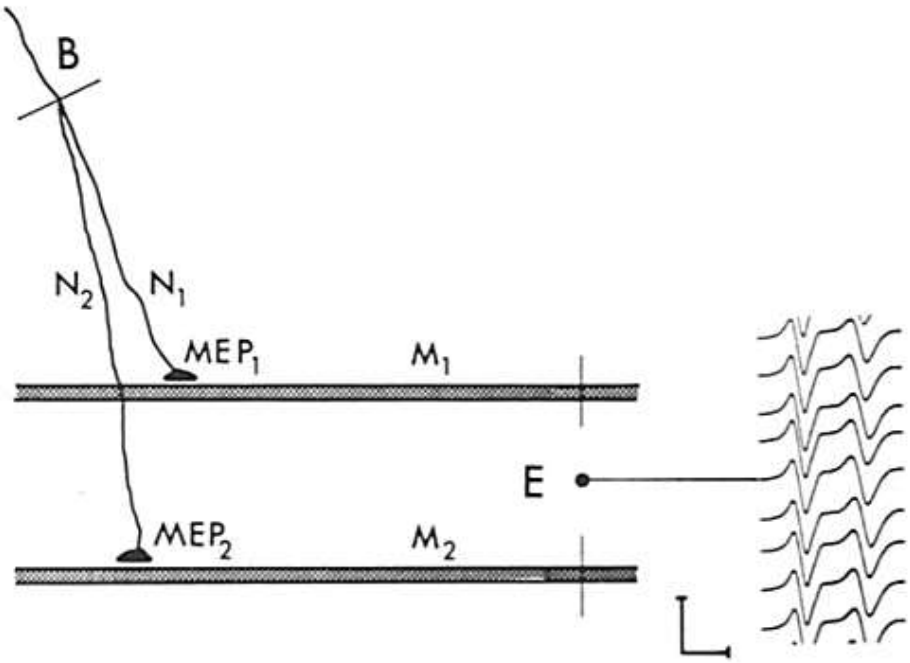

Figura 4 - Representação da unidade motora e do registro dos potenciais de ação de fibras musculares individuais. Duas fibras musculares (M1 e M2) inervadas por um axônio que se divide no ponto B em duas fibras nervosas terminais (N1 e N2). O eletrodo (E) registra um par de potenciais de ação, um de M1 e outro de M2. O intervalo de tempo entre os dois potenciais de ação das fibras musculares varia em descargas consecutivas (o jitter), por causa das diferenças no tempo de transmissão nas duas vias, entre B e E, sobretudo na transmissão sináptica na placa motora terminal (MEP1 e MEP2)[31]

1.3 Relação Fenótipo/Genótipo

Em comparando com a miastenia gravis autoimune e a síndrome de Lambert-Eaton, a SMC é dos mais raros distúrbios miastênicos, com uma prevalência estimada de 1-9 / 1.000.000, e apresentam grande diversidade clínica e molecular[33]. As primeiras mutações que foram reconhecidas como causadoras de SMC são aquelas em genes que codificam subunidades do AChR. O AChR nicotínico do músculo estriado é composto de 5 subunidades: 2 subunidades alfa, 1 beta, 1 delta, e 1 épislon (no adulto) ou 1 gama (no feto). Cada subunidade é codificada por um gene diferente. O gene da subunidade épsilon do AChR (*CHRNE*) é o mais frequentemente acometido dentre as SMC. Apesar de já terem sido descritos mais de 30 genes causadores de SMC (Quadro 1), o *CHRNE* é responsável por cerca de 50% dos casos[21]. A prevalência estimada dos genes causadores de SMC está mostrada no Quadro 2, mas, dependendo da região geográfica considerada, há algumas mutações específicas que são muito frequentes. Por exemplo, embora existam várias mutações *CHRNE* descritas, algumas variantes alélicas patogênicas são especialmente frequentes em certos grupos étnicos. A variante patogênica c.1327delG da *CHRNE* está presente em quase 50% dos indivíduos com SMC de origem cigana e / ou em indivíduos do sudeste da Europa[34]. A variante c.1353dupG no mesmo gene está presente em até 20% dos pacientes provenientes da região do Magrebe, especialmente Argélia e Tunísia[35]. Dessa forma, há grande probabilidade nessas regiões de haver uma frequência diferente dos genes causadores de SMC.

Apesar da grande variabilidade fenotípica, há um cenário clínico que é mais característico de SMC: fraqueza fatigável de início precoce (antes dos 2

anos), principalmente afetando musculatura extraocular e/ou bulbar, e alterações na eletroneuromiografia sugestivas de distúrbio de junção (decremento ao estímulo repetitivo, aumento de *Jitter* no estudo de fibra única)[22]. É importante salientar, porém, que não raro a fatigabilidade na SMC se dá ao longo de dias, às vezes semanas, apresentando flutuações por períodos mais prolongados do que geralmente se observa em pacientes com miastenia gravis autoimune. Na miastenia gravis, o que geralmente acontece é uma flutuação dentro de algumas horas ou minutos. História familiar positiva para SMC é um bom indicativo de suspeição da doença, porém na maioria das vezes tal informação não é presente, visto que a grande maioria das formas genéticas que levam a SMC são de padrão de herança autossômica recessiva (exceção apenas para mutações na synaptotagmina 2 e para a síndrome de canal lento, que apresentam padrão de herança autossômica dominante).

Podemos dividir as SMC em: 1) pré-sinápticas, quando a alteração ocorre no axônio terminal do neurônio motor; 2) sinápticas, em que o defeito se localiza em proteínas da própria fenda sináptica; 3) pós-sinápticas, que são causadas por defeitos proteicos da parte especializada do sarcolema, na região peri-sináptica; e 4) outras SMC. Os defeitos pós-sinápticos são os mais comuns, sendo responsáveis por cerca de 80% dos casos, enquanto os defeitos pré-sinápticos são os mais raros. A seguir encontram-se descritas as particularidades mais importantes das SMC relacionadas aos genes mais frequentes.

Quadro 1 - Genes responsáveis por síndromes miastênicas congênitas e a respectiva localização do defeito genético[21]

Localização da Proteína	Genes
Pré-sináptica	*CHAT; SLC5A7; SLC18A3; SYT2; VAMP1; MUNC18-1; SNAP25B; AGRN*
Sináptica	*COLQ; LAMB2; COL13A1; LAMA5*
Pós sináptica	*CHRNA1; CHRNB1; CHRND; CHRNE; CHRNG; DOK-7; MUSK; LRP4; PLEC1; RAPSN; SCN4A;*
Genes de proteínas sem função específica na junção neuromuscular	*GFPT1; GMPPB; DAGPT1; ALG2; ALG14; SLC25A1; PREPL; MYO9A; MUNC18-1;*

Quadro 2 - Proporção estimada dos genes relacionados a síndromes miastênicas congênitas[21]

Gene	% de SMC atribuída a alterações no gene
CHRNE	50%
RAPSN	15-20%
DOK7	10-15%
COLQ	10-15%
CHAT	4-5%
GFPT1	2%
AGRN; ALG2; ALG14; CHRNA1; CHRNB1; CHRND; CHRNG; COL13A1; DPAGT1; GMPPB; LAMA5; LAMB2; LRP4; MUNC18-1; MUSK; MYO9A; PLEC; PREPL; SCN4A; SLC18A3; SLC25A1; SLC5A7; SNAP25; SYT2; VAMP1	<1%

1.4 Síndromes Miastênicas Congênitas Pré-Sinápticas

As formas pré-sinápticas de SMC podem ser subdivididas em duas categorias principais; 1) os envolvidos na síntese e reciclagem de ACh e, 2) os envolvidos no acoplamento das vesículas e na liberação da ACh na fenda sináptica a partir do nervo terminal.

Os genes portadores de mutações causadoras de CMS na via de reciclagem de ACh incluem *SLC5A7*, *CHAT* e *SLC18A3*, os quais codificam o transportador de captação de colina de alta afinidade (muitas vezes descrito

como ChT-1), a acetilcolina transferase e o transportador vesicular de ACh, respectivamente[36]. Todas as síndromes desse grupo compartilham a característica de apresentar crises apneicas com risco de vida no início da vida[36].

O segundo grupo de síndromes pré-sinápticas é composto por síndromes relacionadas a defeitos da liberação de neurotransmissores a partir do terminal do nervo pré-sináptico, devido a mutações que afetam o funcionamento do complexo solúvel da proteína de ligação ao fator sensível à N-etilmaleimida (SNARE). O complexo SNARE é responsável pelo acoplamento da membrana vesicular, fusão e liberação de ACh da membrana pré-sináptica, e é formado principalmente por sinaptobrevina (gene *VAMP1*), a sintaxe e a proteína 25B associada ao sinaptossoma e sintaxina (gene *SNAP25B*)[36]. Há ainda nesse grupo síndromes relacionadas a defeitos no gene SYT-2, que codifica a sinaptotagmina 2, responsável por detectar o influxo de cálcio decorrente da ativação de canais de cálcio voltagem-dependente. Por fim, MUNC-13 participa na organização do complexo SNARE[36].

1.4.1 Síndromes relacionas a mutação no gene CHAT

Mutações recessivas no gene *CHAT* reduzem a expressão ou atividade catalítica da enzima ChAT, a principal responsável por produzir acetilcolina. Defeitos nesta enzima levam a um quadro clínico com manifestações desde o período perinatal, de sintomas fatigáveis presentes em musculatura ocular, bulbar e apendiculares, e também, frequentemente comprometimento de musculatura respiratória[37]. O achado marcante dessa forma de SMC é a frequente ocorrência de episódios de apneia. Os episódios de apneia podem ocorrer em qualquer momento da vida, e por várias vezes ao dia, e predominam

nos períodos noturnos, durante o sono[38]. Entre as crises de exacerbação, os sintomas costumam melhorar, podendo o paciente inclusive se manter oligossintomático nesses períodos. Tanto as apneias, quanto os episódios de insuficiência respiratória, tendem a melhorar com a idade. Em relação a tratamento, geralmente há pelo menos um pequeno efeito benéfico de inibidores de acetilcolinesterase, e pode haver efeito adicional de simpatomiméticos também. Vale lembrar que, como muitos subtipos de SMC, os casos de mutação no *CHAT* podem exibir uma marcante variabilidade clínica entre as famílias e mesmo entre indivíduos da mesma família[38-40].

1.5 Síndromes Miastênicas Congênitas Sinápticas

As SMC classificadas como sinápticas são causadas fundamentalmente por defeitos na lâmina basal da fenda sináptica. Alguns subtipos de laminina são expressos seletivamente em espaços sinápticos de junções neuromusculares, atuando tanto na manutenção quanto na sinalização da sinapse[41]. No entanto SMCs relacionadas a defeitos nessas proteínas são excessivamente raras, havendo relatos de caso de pacientes com mutações em homozigose em *LAMA5* e *LAMB2*, sendo que em ambas síndromes há importantes manifestações não miastênicas[42,43]. Já o colágeno tipo XIII alfa 1 é uma proteína transmembrana com um ectodomínio colagênico tri-helicoidal com várias conformações básicas. Uma delas é ancorada na membrana plasmática via domínio trans-membrana, e uma outra resulta da clivagem proteolítica do ectodomínio para produzir um produto solúvel que interage com os componentes da lâmina basal – ambas atuam na maturação inicial das estruturas da junção neuromuscular nos lados pré e pós-sináptico, de maneira independente da via

agrina-LRP4-MuSK-Dok-7[44]. O quadro clínico de defeitos homozigóticos em *COL13A1* (gene que codifica o colágeno XIII) é principalmente composto de hipotonia neonatal, escoliose, dificuldades respiratórias, fraqueza marcada da flexão cervical e ptose palpebral bilateral não fatigável[45].

1.5.1 Síndromes relacionas a mutação no gene COLQ

SMC causadas por mutações no gene *COLQ* possuem um fenótipo amplo que varia de fraqueza em cinturas de início no adulto, sendo diagnóstico diferencial das distrofias musculares de cinturas, até de manifestações mais graves e progressivas de início precoce[46]. Uma manifestação clínica característica dessa forma de SMC é a lentificação do reflexo pupilar, mas que ocorre em apenas cerca de 25% dos casos. As mutações no *COLQ* resultam em deficiência sináptica de acetilcolinesterase, pois este gene é responsável por expressar a calda colagênica que ancora a acetilcolinesterase na fenda sináptica (peptídeo da cauda colagênica da acetilcolinesterase, Colq). Portanto, clinicamente, esses pacientes podem não responder ou mesmo piorar se receberam inibidores de acetilcolinesterase. No entanto, eles geralmente respondem bem aos simpaticomiméticos (por exemplo, efedrina e salbutamol). Além de uma resposta com decremento após estímulo repetitivo e o aumento do *jitter* no estudo de fibra única, até 50% dos pacientes com SMC relacionada ao *COLQ* também podem demonstrar um potencial motor duplo característico[47-49]. Este potencial duplo, por vezes múltiplo, ocorre devido ao tempo prolongado de abertura dos AChRs aos quais a acetilcolina fica muito tempo ligada por causa da ação diminuída da acetilcolinesterase (que precisa do perfeito funcionamento da Colq para ter seu máximo de função) [47-49].

1.6 Síndromes Miastênicas Congênitas Pós-Sinápticas

As SMC classificadas como pós-sinápticas são causadas fundamentalmente por defeitos que levam a diminuição de número de receptores de acetilcolina (AChR) funcionantes na membrana pós-sináptica, desorganização da membrana, ou a distúrbios cinéticos dos receptores (com fechamento do canal mais lenta ou mais rapidamente). A maioria das mutações que levam a esse subtipo de SMC ocorrem em genes que codificam subunidades do AChR ou proteínas que interagem com a via agrina-LRP4-MuSK-Dok-7. Agrina é uma grande proteoglicana de matriz extracelular. Possui várias isoformas e é sua isoforma neural que desempenha um papel fundamental na manutenção da estrutura sináptica através da ligação ao LRP4 que, por sua vez, liga e ativa o MuSK[50]. O sequenciamento de nova geração (NGS) facilitou muito a detecção de mutações nos genes que codificam essas proteínas, aumentando o espectro fenotípico de SMC relacionadas a mutações nestes genes. De forma mais marcante podemos falar das síndromes do *MUSK*, como SMC de cinturas de instalação tardia[51], paralisia isolada das cordas vocais[52] *,* ou insuficiência respiratória associada à gravidez[53].

1.6.1 Síndromes relacionas a mutação no gene CHRNE

Mutações no *CHRNE,* que levam a perda de função, são a causa mais comum de SMC em todo o mundo, e levam, em última instância, a diminuição de números de AChR efetivos na junção neuromuscular[21]. Esse gene codifica a subunidade épsilon do AChR, e tais mutações levam à deficiência de AChR na placa motora. Os pacientes geralmente apresentam oftalmoparesia, ptose

palpebral, disfagia e fraqueza muscular proximal, com início antes dos 2 anos de idade. Apesar da típica presença sintomas flutuantes, o curso clínico é geralmente estável e na maior parte dos casos sem crises graves de fraqueza[21]. Os pacientes geralmente respondem bem a inibidores de acetilcolinesterase, embora a oftalmoparesia seja usualmente resistente ao tratamento. A mutação c.1327delG é frequente em pacientes europeus de origem étnica cigana (“gipsy”) e de origem do sudeste europeu[34].. Já no Brasil, a mutação c.130dupG é responsável por cerca de 1/3 de todos os casos de SMC, segundo uma coorte de 18 famílias provenientes do estado do Paraná[54].

1.6.2 Síndromes relacionas a mutação no gene RAPSN

As mutações no gene *RAPSN* levam à deficiência de AChR, embora este subtipo de SMC seja fenotipicamente distinto da deficiência de AChR devido a mutações de alguma das subunidades. Dois fenótipos de SMC devido a mutações do *RAPSN* foram descritos: o fenótipo de início tardio e o fenótipo de início precoce[55]. Nos casos de início tardio as manifestações costumam se apresentar no final da infância ou mesmo na idade adulta com fraqueza fatigável dos membros superiores e inferiores. O fenótipo de início precoce, que é mais comum, se caracteriza por crises de apneia que ameaçam a vida desde o nascimento, além de hipotonia e complicações congênitas como a artrogripose. As características adicionais incluem palato alto e fraqueza facial, cervical e bulbar. A ptose palpebral pode estar presente, mas a oftalmoparesia não é típica[56]. Uma mutação de perda de sentido (*missense*) comum no *RAPSN* (c.264C>A; p.N88K) é frequentemente detectada em pacientes de origem

Europeia e norte-americana[57,58]. A maioria dos pacientes tem ao menos alguma resposta a inibidores de acetilcolinesterase[56].

1.6.3 Síndromes relacionas a mutação no gene DOK7

A proteína Dok-7 é um fator essencial para maturação e manutenção da placa motora[59]. SMC por mutações no gene *DOK7* é o segundo subtipo mais comum no Brasil e no mundo[21,54]. Pacientes com mutações em *DOK7* frequentemente iniciam quadro clínico no final da infância, mas as apresentações na idade adulta ou no começo da infância são bem reconhecidas. Este subtipo de SMC tipicamente exibe um padrão de fraqueza de cinturas e uma lordose lombar exagerada que se manifesta com um andar típico, com intensa báscula de quadril. No entanto, como diferencial das distrofias musculares de cinturas, os níveis séricos de CPK (creatina fosfoquinase) aqui são usualmente normais. Ptose palpebral está frequentemente presente, mas a oftalmoparesia é rara. Além disso, atrofia de músculos da língua pode servir como uma pista diagnóstica[60]. Os pacientes são frequentemente diagnosticados erroneamente como distrofia muscular de cinturas. Geralmente, não há resposta ou piora com a terapia com inibidores de acetilcolinesterase, mas a maioria dos pacientes apresenta uma resposta satisfatória à terapia simpatomimética com efedrina ou salbutamol[41]. A duplicação c.1124_1127dupTGCC (localizada no exon 7) é comumente encontrada em pelo menos um alelo nesses pacientes[61].

1.7 Síndromes Miastênicas Congênitas por Defeitos de Glicosilação

A via de glicosilação ligada à asparagina (ligada à N) é um processo presente em todas as células eucarióticas, onde há ligação sequencial das

porções de açúcar a um lipídio de membrana que é então transferido para uma proteína. A adição e processamento desses glicanos são cruciais para o dobramento, montagem, estabilidade e transporte intracelular de proteínas. As mutações nos genes que codificam os componentes dessa via levam frequentemente a consequências graves, causando distúrbios multissistêmicos muitas vezes fatais. No entanto, um grupo de SMC, caracterizado por um padrão de fraqueza cintura-membros com pouco envolvimento ocular ou facial, apresenta mutações nas proteínas que contribuem para os primeiros passos da via de glicosilação[62-66]. A junção neuromuscular é conhecidamente glicosilada intensamente e parece provável que seja sensível a distúrbios leves na função das etapas iniciais da via de glicosilação ligada a porção N. Então diferentes mutações em um mesmo gene, por exemplo, *DPAGT1*, podem levar a um distúrbio multissistêmico grave ou a um distúrbio miastênico no qual a fraqueza muscular fatigável é o único sintoma presente. Mutações que levam a distúrbios menos intensos são aquelas que provavelmente se correlacionam com o fenótipo de SMC apenas.

1.7.1 Síndromes relacionas a mutação no gene GFPT1

Mutações no gene *GFPT1* leva a distúrbios da glicosilação, que é uma modificação essencial para mais da metade de todas as proteínas do organismo, e ocorre logo após a tradução proteica. A *GFPT1* está envolvida na síntese da enzima limitante necessária para a glicosilação ligada a nitrogênio e oxigênio[67]. Muitas proteínas da junção neuromuscular são glicosiladas, mas a razão pela qual os defeitos em tais processos biológicos fundamentais levaria a síndromes clínicas restritas a uma disfunção da junção ainda não é clara, mas, como foi dito

acima, provavelmente se dê devido a possível maior sensibilidade da junção, que apresenta disfunção mesmo em distúrbios leves da via.

Pacientes com SMC por defeitos nesse gene se apresentam com fraqueza predominante nas extremidades inferiores e superiores e ptose palpebral sem oftalmoparesia, como é o fenótipo típico da SMC secundárias a distúrbios da glicosilação. Os pacientes exibem várias características que se superpõem com as miopatias, incluindo características miopáticas na eletromiografia (além do decremento ao estímulo repetitivo), infiltração gordurosa em ressonância magnética de músculos e CPK ligeiramente elevada em alguns casos. Na maioria desses pacientes, a biópsia muscular demonstra agregados tubulares, cuja presença pode permitir que esses pacientes sejam distinguidos de outras causas de SMC com fraqueza de cinturas (DOK7, por exemplo)[67,68].

1.8 Síndromes de Canal Lento e de Canal Rápido (Distúrbios de Cinética do AChR)

Embora a maioria das SMC causados por mutações em subunidades do AChR resulte na redução da expressão de AChRs (deficiência de AChR), algumas dessas mutações alteram as propriedades cinéticas do receptor, que possui propriedades de um canal iônico. Essas mutações podem estar localizadas em genes codificadores de diferentes subunidades do AChR (alfa, beta, delta ou épsilon), e causam as chamadas síndromes de canal rápido e síndromes de canal lento, que muitas vezes possuem características clínicas distintas[69,70].

Nas síndromes de canal rápido as propriedades do canal (ou seja, o receptor de acetilcolina) são alteradas para causar um fechamento inapropriadamente rápido do canal após a ligação de acetilcolina. Portanto, enquanto as quantidades normais de acetilcolina são liberadas, a abertura de AChR abreviada leva a um potencial de membrana anormalmente pequeno, que falha para alcançar o limiar de despolarização da fibra muscular[69]. Clinicamente, o SMC de canal rápido caracteriza-se por fraqueza fatigável grave com crises respiratórias[70]. Geralmente respondem a inibidores de acetilcolinesterase, o que pode ser melhorado ainda mais com a adição de 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), efedrina ou salbutamol[71].

A síndrome do canal lento é uma das duas formas autossômicas dominantes das SMC[72]. As mutações (localizadas em um dos genes das subunidades do AChR, *CHRNA*, *CHRNB*, *CHRND*, *CHRNE*) que a causam levam a abertura prolongada da AChR após a ligação da acetilcolina. A idade de início e gravidade deste subtipo mostram grande variabilidade, embora o início dos sintomas seja tipicamente no final da infância. O envolvimento seletivo dos extensores dos dedos e flexores do pescoço é típico, e o envolvimento dos músculos cranianos é geralmente pequeno. Uma importante piora dos sintomas clínicos é inevitável quando se utiliza inibidores de acetilcolinesterase, dado o defeito subjacente, e estes devem ser evitados[72]. Os pacientes tendem a responder aos bloqueadores de canais de ação prolongada, como a fluoxetina e quinidina[71].

1.9 Síndromes Miastênicas no Brasil

Dados referentes a genes causadores de SMC no Brasil são limitados a uma pequena coorte de 25 pacientes de 18 diferentes famílias composta por uma população predominante de descendentes de Europeus provenientes do estado do Paraná[54]. De acordo com esse estudo, o gene que parece ser mais frequentemente relacionado à SMC no Brasil é o *CHRNE*, que é causador da doença em até 70% dos casos. A maioria dos pacientes apresentam a mutação c.130dupG, a qual também é comum em Portugal e Espanha[35]. Os pacientes com a mutação apresentaram em sua maioria o mesmo haplótipo, sugerindo um efeito fundador. A segunda forma mais comum no Brasil é a relacionada com o gene *DOK7*[54]*.* Ao contrário do que acontece na população europeia, onde variantes no gene *RAPSN* são as mais frequentemente descritas, variantes no gene *RAPSN* não foram encontradas nessa coorte Brasileira[54].

1.10 Justificativa

Dada a escassez de dados sobre SMC no país, se faz necessário uma avaliação de uma coorte mais representativa da população. Aumentando-se o número de pacientes brasileiros estudados aumenta-se a chance de se identificar padrões clínicos e genéticos característicos da nossa população e até mesmo de descobrir novos genes.

Além disso, uma coorte que abranja outras regiões de um país tão heterogêneo como o Brasil poderia verificar se os achados peculiares quanto a frequência de genes relacionados a essa síndrome se repetem também em outras regiões. Consideramos importante validar os achados do estudo realizado no Paraná com pacientes com SMC provenientes do sul do Brasil[54], em uma

nova coorte, e verificar achados tais como: 1) alta frequência da variante c.130dupG no gene *CHRNE* dentre os pacientes com SMC; 2) ausência de outras variantes frequentemente encontrada em países europeus, em especial a p.N88K no gene *RAPSN* e a c.1327delG no gene *CHRNE*; 3) ausência de SMC devido a mutações nos genes *RAPSN* e *CHAT*, que são tidos na literatura como genes relativamente frequentes.

Finalmente, a avaliação mais recente de uma coorte, traria o benefício de verificar a ocorrência de mutações em genes recentemente atribuídos a SMC, inclusive utilizando técnicas mais modernas, como o sequenciamento de nova geração. Após 2010, quando se publicou o estudo no sul do pais, aproximadamente 20 novos genes foram relacionados a SMC, totalizando atualmente mais de 30 genes relacionados a síndrome[33].

2 Objetivos

1) Caracterizar clinicamente os pacientes com SMC no nosso meio

2) Identificar mutações mais frequentes em genes causadores de SMC no nosso meio

3) Correlacionar as mutações encontradas com o quadro clínico dos pacientes

3 Pacientes e Métodos

3.1 Pacientes

Nesse estudo participaram pacientes em acompanhamento regular nos ambulatórios de doenças neuromusculares infantis e de miastenia da Divisão de Clínica Neurológica do HC-FMUSP, no período compreendido entre março de 2015 a março de 2020. Foram coletadas amostras de sangue periférico dos casos índices e de seus familiares após leitura e assinatura do termo de consentimento informado. O projeto foi analisado e aprovado pelo conselho de ética do HC-FMUSP (CAAE: 42612515.2.0000.0068, parecer 1.016.086) (Anexo A).

3.2 Critérios de Inclusão

1. Pacientes com quadro clínico e/ou eletroneuromiográfico sugestivo de SMC (ptose, oftalmoparesia, alterações osteoesqueléticas, sintomatologia que flutua durante o dia, e fatigabilidade).
2. Pacientes com fenótipo de miopatia congênita, de início nos primeiros 2 anos de vida, sem alterações estruturais específicas na biopsia muscular (corpos nemalínicos, centralização nuclear, mini/central-core, desproporção congênita de fibras), e também sem alterações mitocondriais ou metabólicas (glicogenose, lipidose).

3.3 Critérios de Exclusão

1. Pacientes com fenótipo de miopatia e com alterações estruturais específicas na biopsia muscular, ou alterações metabólicas (mitocondriais, glicogenose, lipidose), ou ainda com CPK sérica em níveis muito elevados (> 50x o limite da normalidade)
2. Achados eletroneuromigráficos sugestivos de alterações neurogênicas ou com descargas miotônicas
3. Distrofias musculares com diagnóstico específico definido
4. Uso de drogas que desencadeiam síndrome miastênica, ou síndrome de Eaton-Lambert
5. Reação positiva para anticorpos anti-receptores de ACh ou anti-Musk.

3.4 Avaliação Clínica

Os pacientes foram avaliados pelo autor do trabalho segundo protocolo clínico/neurológico, o qual incluía história clínica (gestacional, neonatal, de desenvolvimento e evolução), história familiar e exame físico e neurológico, incluindo avaliação de função motora (capacidade máxima de deambulação, capacidade de levantar da posição sentada, capacidade de levantar do chão) e escala MRC (Medical Research Council) de força muscular dos principais grupos musculares. A avaliação da função motora se deu em dois tempos: antes e depois de realizar manobras de fatigabilidade.

3.5 Exames Subsidiários

Rotineiramente, todos os pacientes com suspeita de miopatia congênita ou de SMC dos ambulatórios participantes são submetidos a

eletroneuromigorafia (ENMG) dos 4 membros e músculos da face, sendo sempre avaliados as conduções dos principais nervos, eletromiografia dos principais grupos musculares, além de ser pesquisado decremento após estímulo repetitivo em membro superior e face, e na maioria dos casos, estudo de jitter com agulha concêntrica nos músculos orbiculares dos olhos. Desta forma os resultados dos exames de ENMG já realizados previamente foram incluídos na análise dos dados. Da mesma forma, dosagem de CPK, dosagem de auto-anticorpos e biopsia muscular, realizados previamente, também foram incluídas na análise dos dados.

3.6 Extração de DNA

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi coletada uma amostra de 5 a 10 ml de sangue periférico dos pacientes e dos familiares no Laboratório Central do HC-FMUSP (Anexo B). Este material foi enviado para o LIM15 da FMUSP, onde foi realizada a extração de DNA linfocitário usando protocolo descrito por Miller et al (1988)[73] .

3.7 Sequenciamento Direto (SANGER)

Como primeira etapa, foi investigada a presença das 4 mutações mais frequentemente descritas nas populações europeia e brasileira: 1) mutação c.130dupG (p.E44Gfs*3) no gene *CHRNE*, com amplificação e sequenciamento da região correspondente ao exon 2 do gene; 2) mutação c.1327delG (p.E443Kfs*64) no gene *CHRNE*, com amplificação e sequenciamento de regiões correspondes aos exons 11 e 12 do gene; 3) mutação c.1124_1127dupTGCC (p.A378Sfs*30) no gene *DOK7* , em que foi amplificado

e sequenciado região correspondente a aproximadamente 1000 pares de base do exon 7 do gene; e 4) mutação c.264C>A (p.N88K) no gene *RAPSN,* em que foi amplificada e sequenciada região correspondente ao exon 2 do gene. Na tabela 1 encontram-se as sequencias de oligonucleotídeos utilizados.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados para pesquisa das 4 mutações mais frequentemente descritas nas populações europeia e brasileira

Produto (gene / exon)	Mutação alvo	Primer sense	Primer antisense	Temperatura de anelamento
CHRNE / 2	c.130dupG	5'-TGACCCTTCCTTCTTGACCC-3'	5'-GCTTAC CAGTGAGATGAGATTCG-3'	62 ºC
CHRNE / 11-12	c.1327delG	5'-CTGGAGATGGGTGGGAAATTG-3'	5'-CACGGAGCGAGCTCGTGTTTGA-3	65 ºC
RAPNS / 2	c.264C>A	5'-GAGGATGCCGACTTCCTCCTGG-3'	5'-TGGTACCAGGCAGCCCAAGGC-3'	58 ºC
DOK7 / 7	c.1124_1127dupTGCC	5'-AGCAATCCTCGTCGTCAGCCAGCAC-3'	5'-AAGAAAGCCGGGGGTGGCCCCG-3'	55 ºC

Inicialmente, os exons escolhidos foram amplificados em termocicladora da marca Eppendorf, utilizando-se pares de oligonucleotídeos (Tabela 1) e método descritos por Laporte et al.[74], o qual, resumidamente, submete uma solução com volume final de 25 µL, cerca de 100 ng de DNA, 10 mM de Tris-HCl com pH de 8.3 como tampão de reação, 200 µM de dNTP, 1.5 a 2.0 mM MgCl2, 10 pmol de cada primer e 1 U de Taq polimerase, a um protocolo de PCR (reação de polimerase em cadeia) que consiste nas seguintes etapas: inicialização a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) seguida de anelamento na temperatura indicada na tabela 1 por 15 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e finalmente uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. A qualidade do produto de PCR foi verificada através de corrida em gel de agarose a 2% por 40 minutos. Essa primeira etapa de rastreio para mutações comuns foi realizada integralmente pelo autor do trabalho, no laboratório do LIM15 da FMUSP.

Posteriormente, para aqueles casos em que apenas uma mutação em heterozigose foi identificada em um gene compatível com quadro clínico, todo o restante da região codificadora do gene em questão foi sequenciada em busca de uma outra mutação. Em casos que outra mutação foi encontrada em heterozigose, familiares do paciente foram testados para verificar segregação compatível com heterozigose composta. Essa etapa foi realizada pelo autor deste trabalho durante estágio de doutorado sanduíche na plataforma de sequenciamento e genômica do Institute of Genetic Medicine da Newcastle University, Newcastle upon Tyne, Reino Unido, sob supervisão do professor Hanns Lochmüller.

Para todas essas etapas citadas, os fragmentos de PCR amplificados foram sequenciados utilizando sequenciador automático (Applied Biosystems ABI 3130, Foster City, CA, EUA) disponibilizado em serviço multiusuário da FMUSP (LIM56) ou no Institute of Genetic Medicine da Newcastle University . A análise dos fragmentos sequenciados foi realizada através do programa *Mutation Surveyor Demo V 3.20,* com funcionalidade de busca de mutações. As sequências foram comparadas com as sequências dos genes selvagens em questão. As correspondentes versões das sequências genômicas foram RefSeq NM_000080.3 (*CHRNE*); NM_005055.3 (*RAPSN*); NM_173660.4 (*DOK7*).

3.8 Sequenciamento de Exoma

DNA enriquecido dos pacientes não resolvidos com as etapas descritas acima foi submetido a técnicas de alto débito para sequenciamento de exoma, as quais foram realizadas no Instituto Broad do MIT, na plataforma Genomics da Harvard (Cambridge, MA, EUA). Para tal foi utilizado > 250 ng de DNA (> 2 ng /

µl) com captura de 38 Mb. Inicialmente, o DNA foi submetido a controle de qualidade através de corrida de DNA genômico bruto em gel de agarose a 2%, além de quantificação através do espectrofotômetro de micro-volume Nanodrop (ThermoScientific, EUA) e fluorômetro Qubit® 2.0 (Life technologies, EUA). Todas as amostras de DNA passaram nos testes de qualidade.

A primeira etapa do protocolo de preparação para sequenciamento de alto débito foi a fragmentação do DNA genômico por sonicação, com o objetivo de produzir fragmentos ao redor de 200 pares de base. Depois, a captura foi realizada através do kit Agilent SureSelect All Exon V5 da empresa Agilent (Santa Clara, CA, EUA). Para a captura, inicialmente foi feita a ligação de adaptadores do kit Agilent a ambas extremidades dos fragmentos de DNA gerados, seguida da seleção de fragmentos entre 200 e 400 pares de base. Em seguida, foi realizada reação de PCR para enriquecer seletivamente tais fragmentos. O produto desta PCR é purificado através de método usando esferas magnetizadas AMPure do kit SureSelect, e a seguir verificado através do aparelho LabChip GX. A próxima etapa, hibridização, foi feita segundo protocolo detalhado pela empresa Agilent para o kit de captura, o qual envolve a adição sequencial de um tampão de hibridização, RNAse de bloqueio, e biblioteca de captura SureSelect às amostras dentro de um termociclador ajustado a temperaturas específicas, para finalmente mantê-las por 24 horas a 65°C. A biblioteca de captura hibridizada é separada através de esferas magnetizadas de estreptavidina previamente preparadas com buffer de ligação do kit SureSelect, purificada com esferas magnetizadas AMPure do mesmo kit, amplificada através de uma reação de PCR pós-captura padrão usando marcadores do kit SureSelect, com 12 ciclos a uma temperatura de anelamento

de 60°C, e finalmente purificada mais uma vez com as esferas AMPure. O produto final foi analisado no aparelho LabChip GX, e em seguida transferido para os aparelhos de sequenciamento de alto débito.

O sequenciamento foi realizado nos instrumentos Illumina Hiseq2500 de acordo com as instruções do fabricante (San Diego, CA, EUA), gerando dados brutos de sequenciamento no formato FASTQ. As sequências em formato FASTQ foram alinhadas (mapeadas) com o genoma referência hg19/GRCh37 através do software BWA-mem (v0.7.8), e GATK Haplotype Caller (v3.6) gerando arquivos gVCFs. O controle de qualidade dos dados brutos foi feito através do softwares GATK. As variações de baixa qualidade foram filtradas usando um índice de qualidade ≥20 (Q20). Todas as amostras passaram no controle de qualidade, com cobertura mínima de 8X. Alinhamento e reconhecimento de variantes foram realizados usando Burrows-Wheeler Aligner e Genome Analysis ToolKit, respectivamente. As leituras de sequenciamento foram alinhadas ao genoma de referência humano do NCBI (hg19) usando Burrows-Wheeler Aligner. A análise e filtragem de variantes listadas no arquivo VCF foi realizada através do Genome-Phenome Analysis Platform, (platform.rd-connect.eu) com as opções "*default"*, gerando um arquivo BAM. Essa última parte foi realizada pelo autor do trabalho em colaboração e com auxílio do Institute of Genetic Medicine da Newcastle University, Newcastle upon Tyne, reino Unido, sob supervisão do professor Hanns Lochmüller durante estágio de doutorado sanduíche.

A nomenclatura das mutações seguiu as recomendações publicadas por den Dunnen et al., 2000[75]. As mutações encontradas foram comparadas com os bancos de dados HGMD (http://www.hgmd.cf.ac.uk), ExAC

(http://exac.broadinstitute.org), gnomAD (http://gnomad.broadinstitute.org) e BIPMed (http://www.bipmed.org). Variantes provavelmente patogênicas, que afetam a função do gene e potencialmente causam a doença, foram identificadas pela aplicação de critérios de filtragem padrão: frequência de alelo menor <1% e preditor de efeito variante alto a moderado (ou seja, variantes nonsense, em sítio de splice, em frameshift, in-frame e variantes não sinônimas). As variantes pré-selecionadas foram interrogadas por sua predição in silico deletéria e associação anterior conhecida com doença humana. Os dados genômicos e fenotípicos foram submetidos à plataforma RD-Connect (identificadores listados na tabela do apêndice).

A Figura 5 mostra fluxograma das etapas realizadas para diagnóstico molecular.

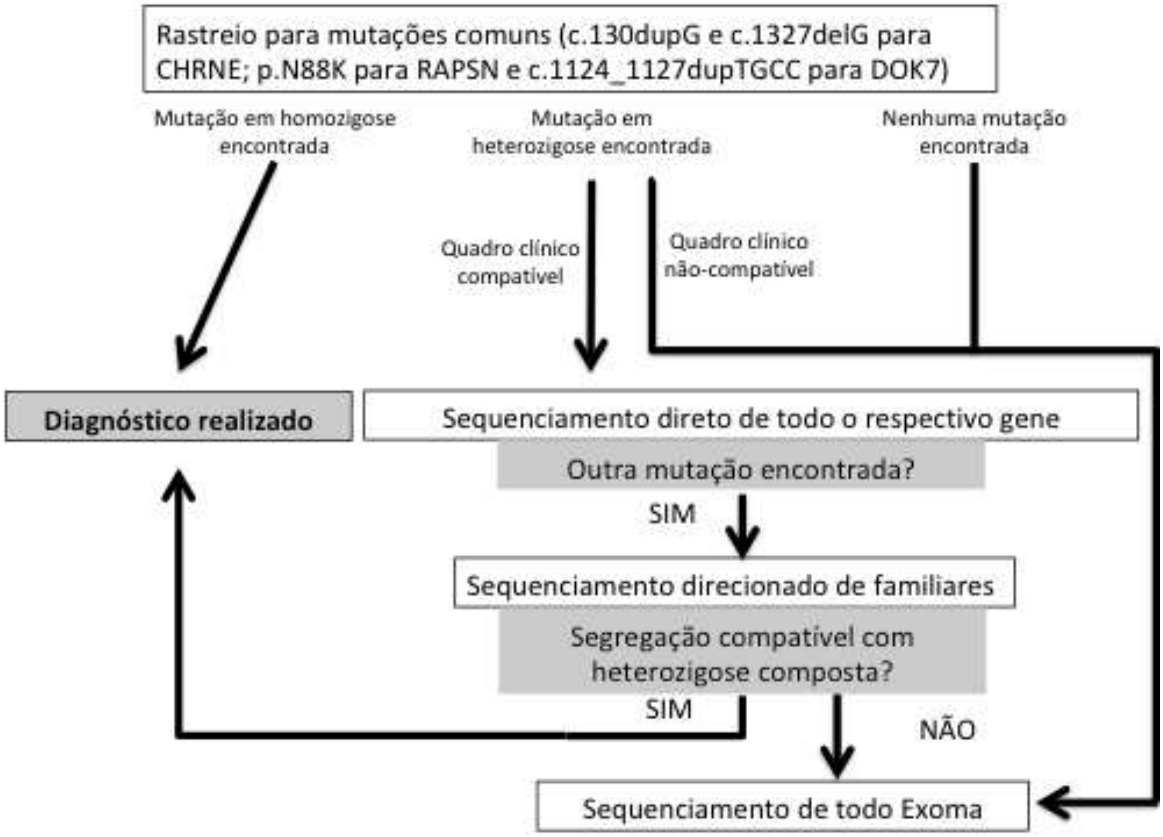

Figura 5 - Fluxograma das etapas realizadas para diagnóstico molecular

3.9 Análise Estatística

Após a análise molecular completa, os casos foram estratificados em quatro categorias: diagnóstico molecular confirmado de CMS, diagnóstico molecular confirmado de uma condição diferente de CMS (não-CMS), diagnóstico molecular provável de CMS e não resolvido. Os casos prováveis foram aqueles em que uma única variante patogênica altamente plausível foi encontrada em uma condição tipicamente autossômica recessiva, e aqueles em que duas prováveis variantes patogênicas foram encontradas com uma síndrome correspondente não totalmente típica. Os achados clínicos foram comparados entre o grupo com diagnóstico molecular confirmado de CMS e o grupo sem diagnóstico molecular ou com diagnóstico molecular não-CMS. Os

pacientes classificados como prováveis foram excluídos da comparação. O teste exato de Fisher de dupla cauda foi usado para calcular os valores de p em tabelas de contingência 2 × 2 (http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2.cfm).

4 Resultados

Dos 81 pacientes incluídos inicialmente, dois foram excluídos, um eventualmente diagnosticado como miastenia gravis autoimune e outro eventualmente diagnosticado como doença mitocondrial. No final, foram incluídos no estudo 79 pacientes de 68 famílias, os quais respeitaram os critérios de inclusão e exclusão, sendo 45 do sexo feminino (57%) e 34 do sexo masculino. Todos foram avaliados clinicamente pelo autor do estudo e tiveram seus dados de prontuário detalhadamente revisados pelo mesmo, sendo então submetidos às etapas para diagnóstico molecular descritas na sessão de métodos. A média de idade na avaliação foi de 26,7 anos (variando de 1 a 69 anos). Dos 79 pacientes, todos apresentavam dados de ENMG, e em 38 pacientes eletromiografia de fibra única com agulha concêntrica dos músculos orbiculares dos olhos foi realizada. Dados de biópsia muscular foram coletados de 41 pacientes, e todos tiveram prescrito por algum período piridostigmina como tentativa de tratamento. Em relação ao local de habitação, 66 pacientes eram do estado de São Paulo, 4 de Minas Gerais, 3 da Bahia, 2 do Paraná, 2 do Amazonas, 1 de Pernambuco, 1 do Ceará. (Figura 6).

A tabela do apêndice apresenta todos os pacientes, suas classificações diagnósticas (confirmado SMC, provável SMC, não-SMC e não resolvido), as variantes encontradas e as principais características delas, além dos identificadores registrados no sistema RD-Connect.

Figura 6 - Gráfico em escalas de cinza mostrando a distribuição das origens dos pacientes incluídos no estudo

4.1 Pesquisa da Mutação c.130dupG no Gene *CHRNE*

Dentre as 68 famílias testadas, a mutação c.130dupG (p.E44Gfs*3) foi encontrada em 21 (31%), sendo em homozigose em 18 famílias (26,5%) e em heterozigose em 3 (24 pacientes com a mutação em homozigose e 5 em heterozigose). Destes 29 pacientes, 22 foram publicados em um estudo do nosso grupo, com colaboração de outros centros nacionais, em que foi comprovada a relativamente alta prevalência dessa mutação em diferentes regiões do país, e foram caracterizados clinicamente os pacientes homozigotos[76] (Anexo C).

Além desses, o sequenciamento Sanger do exon 2 do gene *CHRNE* também identificou duas pacientes com outras variantes em homozigose, uma predita como patogênica (c.92C>T, p.Leu31Pro) e previamente já descrita como

causadora da síndrome (https://databases.lovd.nl), e outra considerada nova (c.122C>T; p.Pro41Leu) (Figura 7).

Dentre as três famílias com a mutação c.130dupG em heterozigose, uma outra variante patogênica foi encontrada em 2, após sequenciamento Sanger de todo o gene *CHRNE*. Dois irmãos foram diagnosticados com a variante intrônica c.803-2A>G, localizada em sítio receptor de splicing, previamente descrita como patogênica[77]. Outros dois irmãos apresentaram a variante c.858_859dup (p.L287Sfs *14), predita com patogênica, porém ainda não reportada em nenhum banco de dados. Nesses 4 casos, os DNAs dos pais foram testados confirmando segregação das mutações e, portanto, heterozigose composta. Em um paciente com a mutação c. 130dupG em heterozigose não foi possível identificar outra variante.

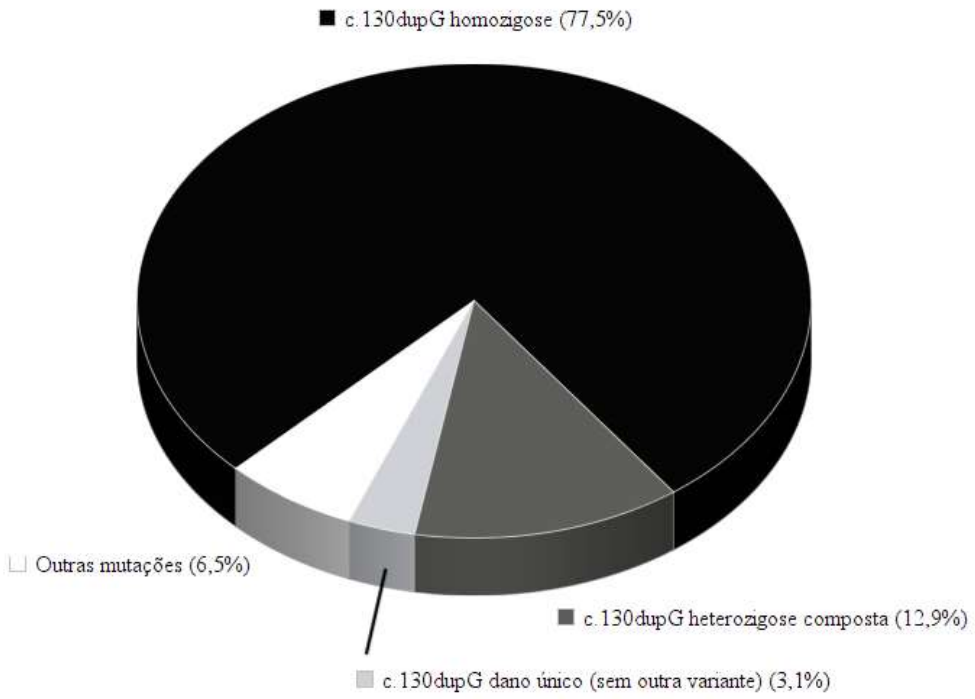

Figura 7 - Porcentagem da presença da mutação c.130dupG dentre os casos de SMC *CHRNE*

4.2 Pesquisa da Mutação c.1327delG no Gene *CHRNE*

Excluindo-se os 31 pacientes com mutações no gene *CHRNE* diagnosticadas na etapa anterior (29 com c.130dupG e 1 com c.122C>T e 1 com c.92C>T), 48 pacientes (de 45 famílias) tiveram o DNA sequenciado para pesquisa da mutação c.1327delG (p.E443Kfs*64) no gene *CHRNE* (exons 11 e 12). Em nenhum deles tal mutação foi encontrada, e também não foi encontrada nenhuma outra variante inédita ou preditiva de patogenicidade localizada na região amplificada.

4.3 Pesquisa da Mutação p.N88K (c.264C>A) no Gene *RAPSN*

Os mesmos 48 pacientes (45 famílias) testados para a mutação c.1327delG foram testados para a mutação p.N88K no gene *RAPSN*. Em 5

pacientes de diferentes famílias (7,5% do total de famílias) a mutação foi encontrada. Dois destes apresentaram a mutação em homozigose, e 3 outros em heterozigose. Nos 3 pacientes com a mutação em heterozigose outra variante foi encontrada com sequenciamento Sanger de toda região codificadora e fronteiras intrônicas do gene *RAPSN*:c.493G>A (p.V165M), já descrita previamente como patogênica[78]; c.490C>G (p.Arg164Lys) também já descrita como patogênica[79], e c.61C>T (p.Gln21*), ainda não reportada. Sequenciamento dos pais dos 3 pacientes demonstrou que as mutações segregam de forma a configurar heterozigose composta.

Três (2 homozigotos e 1 heterozigoto) destes 5 pacientes foram publicados por estudo do nosso grupo que mostrou importante variabilidade em casos com p.N88K[80] (Anexo D).

4.4 Pesquisa da Mutação c.1124_1127dupTGCC no Gene *DOK7*

Excluindo-se os 36 pacientes resolvidos com as etapas anteriores (com 1 considerado provável *CHRNE*), 43 pacientes (40 famílias) tiveram o DNA sequenciado para pesquisa da mutação c.1124_1127dupTGCC (p.A378Sfs*30) no gene *DOK7*. A mutação foi encontrada em 3 pacientes de famílias diferentes (4,4% do total de famílias), sendo dois em homozigose e um em heterozigose. No paciente com mutação em heterozigose, uma outra variante patogênica foi encontrada após sequenciamento Sanger de todo o gene *DOK7*, c.1357_1370del14 (p.L454Pfs*60), a qual é predita como patogênica e já foi previamente descrita como causadora de SMC[81]. Sequenciamento dos familiares dos pacientes confirmaram heterozigose composta.

4.5 Análise de EXOMA

Os 40 pacientes (de 39 diferentes famílias) sem mutação compatível encontrada nas etapas anteriores foram submetidos a análise de todo o exoma. Desta última análise foram encontradas variantes preditas como patogênicas nos seguintes genes:

- *COL13A1:* 4 pacientes de 3 famílias distintas. Um paciente com c.486delT (p.Gly163Valfs*32) em homozigose. Dois irmãos com a mutação intrônica c.549+5G>A em homozigose. Um paciente com c.833delC (p.Pro278Leufs*65) em homozigose.
- *COLQ*: 3 pacientes de 2 famílias distintas; 2 pacientes irmãos com mutação intrônica em homozigose (c.219+1G>C); 1 paciente com 2 mutações em heterozigose (c.219+1G>C + c.158insC; c.219+1G>C + p.leu53profs*81).
- *CHAT:* 1 paciente com 2 mutações em heterozigose composta no gene (c.1964T>C + c.1145A>G; p.Leu655Pro + p.Glu382Gly).
- *GFPT1*: 2 pacientes de duas famílias distintas, com 2 variantes provavelmente em heterozigose composta (DNA dos pais não disponível), sendo uma com C.652T>G (p.Ser218Pro) + c.275C>T (p.Ala92Val), e outra com c.1375G>A(p.asp459asn) + c.67C>G (p.leu23val).
- *GMPPB*: 1 paciente com c.95C>T (p.Pro32Leu) + c.79G>C (p.Asp27His), provavelmente em heterozigose composta (DNA dos pais não disponível),
- *SCN4A*: 1 paciente com c.692C>T (p.Thr231Met) + c.5511G>C (p.Ter1837Tyrext*50), da qual apenas DNA da mãe foi passível de

análise, onde foi encontrada apenas a segunda mutação, sugerindo heterozigose composta.

- *CHRNA1*: 1 paciente com mutação em homozigose: c.1396G>A (p.Gly466Arg).
- *SCN8A:* 1 paciente com mutação em heterozigose: c.5615G>A (p.Arg1872Gln).
- *VWA3B*: 1 paciente com mutação em heterozigose composta: c.91C>A (p.Gln31Lys) + c.2795G>A (p.Arg932His).
- *DHCR7:* 1 paciente com mutação em homozigose c.278C>T (p.Thr93Met).
- *PTPN11:* 1 paciente com mutação em heterozigose: c.188A>G (p.Tyr63Cys).
- *LDB3:* 1 paciente com mutação em homozigose: c.679C>T (p.Leu227Phe)

Depois de todas as etapas de análise molecular, 23 pacientes de 22 diferentes famílias ainda permaneceram sem diagnóstico molecular confirmado. Destes 23 pacientes, 7 foram considerados como prováveis, por não terem variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas bialélicas (todos com síndromes recessivas), ou por apresentarem variantes novas, provavelmente patogênicas, mas com quadro clínico não totalmente típico. Foi o caso de 4 pacientes *CHRNE* de 3 famílias diferentes e 1 caso de *RAPSN*, todos com mutação em heterozigose, 1 caso *SCN4A* e 1 *CHRND* cujos quadros clínicos não eram 100% típicos. A Tabela 2 mostra a proporção dos genes encontrados no estudo, considerando casos índices, excluindo os diagnosticados como não-SMC (n=5) e os considerados prováveis (n=6), totalizando 57 casos índices. A

Tabela 3 considera os não-SMC e os prováveis, considerando, então, 68 casos índices. A Figura 8 mostra a distribuição dos genes diagnosticados considerando casos índices somente dos confirmados como SMC (41 casos índices).

Tabela 2 - Proporção dos genes encontrados no estudo, excluindo-se casos prováveis e casos não-SMC

Gene	% de SMC atribuída a alterações no gene
CHRNE	38,5%
RAPSN	8,8%
DOK7	5,2%
COL13A1	5,2%
COLQ	3,5%
GFPT1	3,5%
SCN4A	1,7%
GMPPB	1,7%
CHAT	1,7%
CHRNA1	1,7%
Não diagnosticados	28%

Tabela 3 - Proporção dos genes encontrados no estudo, considerando casos não-SMC e casos prováveis

Gene	% de SMC atribuída a alterações no gene
CHRNE	32,3%
RAPSN	7,3%
DOK7	4,5%
COL13A1	4,5%
COLQ	2,9%
GFPT1	2,9%
SCN4A	1,5%
GMPPB	1,5%
CHAT	1,5%
CHRNA1	1,5%
Prováveis	8,8%
Não-SMC	7,3%
Não diagnosticados	23,5%

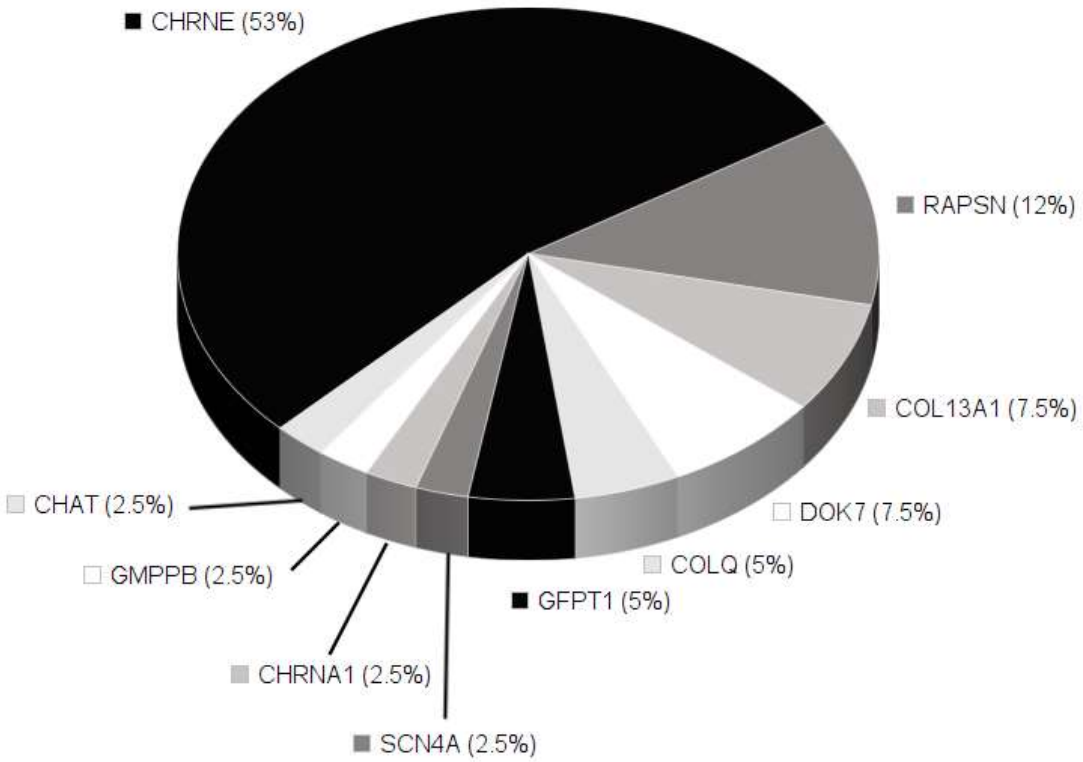

Figura 8 - Distribuição dos genes diagnosticados considerando casos índices somente dos confirmados como SMC

4.6 Aspectos Clínicos dos Pacientes *CHRNE* Confirmados

Dentre os 79 pacientes com SMC incluídos no estudo, 30 foram confirmados como causados por mutação no gene *CHRNE* (26 com mutações em homozigose, e 4 em heterozigose composta), compreendendo 22 famílias não relacionadas entre si. Em 4 pacientes de 3 famílias distintas apenas uma mutação foi encontrada no gene e, como os quadros clínicos desses pacientes são compatíveis, consideramos esses casos como prováveis SMC por *CHRNE*. Destes, em um caso foi encontrada a mutação c.130dupG por sequenciamento Sanger. Em outro caso foi encontrada a variante predita como patogênica c.901G>A (p.Val301Met), por sequenciamento de todo exoma. Em dois irmãos, foi encontrada a variante nonsense predita como patogênica c.393C>G (p.Y131*).

Considerando apenas os casos confirmados (n = 30), as seguintes características clínicas foram muito frequentes: início precoce dos sintomas - antes dos 2 anos - (90%), sintomas flutuantes (100%), comprometimento da musculatura ocular extrínseca (100%), ptose palpebral (100%), fraqueza dos membros (100%), fraqueza facial (83,3%) e sintomas bulbares (76,6%). Curiosamente, a maioria dos pacientes apresentou comprometimento parcial, ao invés de completo, do movimento ocular. Esse foi o caso em 27 dos 30 pacientes com alteração da motricidade ocular extrínseca (90%). Considerando os 27 pacientes com comprometimento parcial, os músculos reto inferiores foram os mais frequentemente poupados, não sendo afetados ou relativamente menos afetados em 83,3% (n=25) dos casos (Figura 9), sendo preservados juntamente com outros músculos ou não.

O prognóstico pareceu ser favorável entre os pacientes *CHRNE*. Evolução estável, com pouca restrição funcional, foi observado em 96,6% deles. No entanto, pelo menos um episódio de exacerbação intensa e aguda dos sintomas, apresentando-se como crise, foi relatado por 46,6% dos pacientes. Em todos esses pacientes quadros infecciosos febris são o principal gatilho para exacerbação dos sintomas. Alta frequência de crise foi relatada em apenas 8 pacientes (26,6%). Melhora dos sintomas com piridostigmina foi observada em todos os pacientes confirmados. Oito pacientes também receberam efedrina (50 mg duas vezes ao dia) e 6 salbutamol, sendo que todos apresentaram melhora adicional dos sintomas. Quanto às alterações neonatais, observou-se atraso motor em 56,6% dos pacientes, hipotonia neonatal em 66,6%, dificuldades de sucção em 50% e palato alto em 76,6% (Figura 10). Escoliose foi observada em

23,3% dos pacientes (Figura 10). Nenhum paciente apresentou quaisquer contraturas congênitas.

Dados de biópsia muscular estavam disponíveis em 12 dos 30 pacientes com mutação bi-alélica confirmada no gene *CHRNE*: 7 (58,3%) foram descritos com atrofia seletiva tipo II, 4 (33,3%) com predominância de tipo I, e 1 (8,4%) como normal. O nível de CPK foi normal em todos os 30 pacientes. Todos os 30 pacientes tinham dados de eletroneuromiografia disponíveis: 27 (90%) apresentaram resposta decremental ao estímulo repetitivo de 3 Hz; em 5 deles, alterações miopáticas associadas foram observadas. Dos 3 pacientes sem resposta decremental ao estímulo repetitivo, 2 foram submetidos ao estudo de fibra única, que demonstrou aumento de Jitter em ambos. Ao todo, estudo de fibra única foi realizado em 9 dos 30 pacientes confirmados como *CHRNE*, em todos houve constatação de aumento de Jitter.

A Tabela 4 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *CHRNE*. A Tabela 5 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

Tabela 4 - Principais achados clínicos dos pacientes *CHRNE*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Mutações em CHRNE
1/1	30/M	+	+	+/+/+	+	+	-	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
2/1	29/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
3/1	12/M	+	+	+/+/+	+	+	+	-	+	c.130dupG/ c.130dupG
6/3	28/F	+	+	+/+/+	+	-	-	-	+	c.130dupG/ c.130dupG
7/3	19/F	+	+	+/-/-	+	+	-	-	+	c.130dupG/ c.130dupG
8/4	13/F	+	+	+/+/-	+	+	+	-	+	c.130dupG/ c.130dupG
17/13	12/M	+	+	+/+/-	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
18/14	22/F	+	+	+/-/-	+	-	-	+	+	c.92C>T/ c.92C>T
19/15	37/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
20/16	10/M	+	+	+/+/+	+	+	+	+	-	c.130dupG/ c.130dupG
24/20	25/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
26/22	4/F	+	+	+/-/-	+	-	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
28/24	34/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
33/28	14/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
39/33	64/M	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.803-2A>G
40/33	54/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.803-2A>G
41/34	8/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
42/35	16/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.858_859dup
43/35	7/M	+	+	+/+/+	+	-	-	+	+	c.130dupG/ c.858_859dup
48/40	38/F	+	+	+/+/+	+	+	-	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
49/41	21/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
50/41	28/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
64/55	41/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
65/55	49/M	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
66/56	33/M	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
67/57	63/M	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
68/58	14/F	+	+	+/+/+	+	+	-	+	+	c.130dupG/ c.130dupG
72/62	35/F	+	+	+/+/+	+	+	+	-	+	c.122C>T/ c.122C>T
75/65	25/M	+	+	+/+/+	+	+	+	+	-	c.130dupG/ c.130dupG
76/65	26/F	+	+	+/+/+	+	+	-	+	+	c.130dupG/ c.130dupG

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 5 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes *CHRNE*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JA FU	ABM/ AT2	CPKN	Mutações em CHRNE
1/1	30/M	+	+	SD	+	SD	+/+	+	c.130dupG/ c.130dupG
2/1	29/F	+	SD	SD	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
3/1	12/M	+	+	SD	+	SD	+/+	+	c.130dupG/ c.130dupG
6/3	28/F	+	SD	SD	-	+	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
7/3	19/F	+	SD	SD	-	+	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
8/4	13/F	+	SD	SD	+	SD	-/-	+	c.130dupG/ c.130dupG
17/13	12/M	+	SD	SD	+	SD	+/+	+	c.130dupG/ c.130dupG
18/14	22/F	+	SD	SD	+	+	+/+	+	c.92C>T/ c.92C>T
19/15	37/F	+	+	+	+	+	-	+	c.130dupG/ c.130dupG
20/16	10/M	+	SD	+	+	+	-	+	c.130dupG/ c.130dupG
24/20	25/F	+	SD	+	+	SD	-	+	c.130dupG/ c.130dupG
26/22	4/F	+	SD	SD	-	SD	-	+	c.130dupG/ c.130dupG
28/24	34/F	+	SD	SD	+	+	+/-	+	c.130dupG/ c.130dupG
33/28	14/F	+	SD	SD	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
39/32	64/M	+	+	SD	+	SD	+/+	+	c.130dupG/ c.803-2A>G
40/32	54/F	+	+	SD	+	SD	+/+	+	c.130dupG/ c.803-2A>G
41/33	8/F	+	SD	SD	+	SD	+/+	+	c.130dupG/ c.130dupG
42/34	16/F	+	SD	+	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.858_859dup
43/34	7/M	+	SD	SD	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.858_859dup
48/39	38/F	+	SD	SD	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
49/40	21/F	+	+	SD	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
50/40	28/F	+	SD	SD	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
64/55	41/F	+	SD	SD	+	+	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
65/55	49/M	+	SD	SD	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
66/56	33/M	+	SD	SD	+	SD	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
67/57	63/M	+	SD	SD	+	SD	+/-	+	c.130dupG/ c.130dupG
68/58	14/F	+	SD	SD	+	+	SD	+	c.130dupG/ c.130dupG
72/62	35/F	+	SD	SD	+	+	SD	+	c.122C>T/ c.122C>T
75/65	25/M	+	+	+	+	SD	+/-	+	c.130dupG/ c.130dupG
76/65	26/F	+	+	+	+	SD	+/-	+	c.130dupG/ c.130dupG

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com pirirdostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

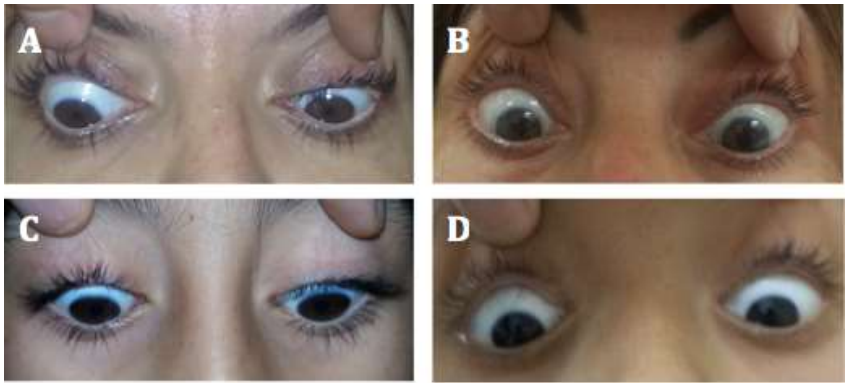

Figura 9 - Relativa preservação dos músculos reto inferiores em pacientes com oftalmoparesia parcial. Os pacientes apresentavam diferentes níveis de comprometimento assimétrico dos movimentos oculares, que não estão relacionados com a idade. A. Paciente 6 (28 anos). B. Paciente 19 (37 anos). C. Paciente 41 (8 anos) D. Paciente 20 (10 anos)

Figura 10 - Aspectos clínicos apresentados por pacientes com mutação homozigótica c.130dupG. A. Escoliose (Paciente 8). B. Palato alto (paciente 20). C. Fraqueza facial (Paciente 24 tentando fazer um sorriso)

4.7 Aspectos Clínicos dos Pacientes *RAPSN*

Cinco pacientes de diferentes famílias foram diagnosticados como SMC devido a mutações no gene *RAPSN.* A Tabela 6 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *RAPSN*. A Tabela 7 mostra dados de exames complementares e

de resposta aos diferentes tratamentos. As Figuras 11 e 12 mostram características de pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *RAPSN*.

Tabela 6 - Principais achados clínicos dos pacientes *RAPSN*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Mutações em CHRNE
18/22	10/M	+	+	+/+/-	+	+	+	-	+	p.N88K/p.N88K
31/26	12/F	+	+	-/-/-	+	+	+	-	+	p.N88K/ p.V165M
32/27	35/M	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	p.N88K/p.N88K
62/53	46/F	-	+	-/-/-	-	+	-	-	+	p.N88K/p.R164K
77/66	1/M	+	+	+/+/-	+	+	+	+	-	p.N88K/p.Q21*

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 7 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes *RAPSN*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/ AT2	CPKN	Mutações em RAPSN
18/22	10/M	+	SD	SD	-	+	SD	+	p.N88K/p.N88K
31/26	12/F	-	SD	SD	+	+	+/-	+	p.N88K/ p.V165M
32/27	35/M	+	+	SD	+	+	-/-	+	p.N88K/p.N88K
62/53	46/F	+	+	SD	+	+	+/-		p.N88K/p.R164K
77/66	1/M	+	-	+	+	SD	SD	+	p.N88K/p.Q21*

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

Figura 11 - Aspectos clínicos do paciente 31, da família 26. A. Palato alto arqueado. B. ptose assimétrica. C. Escápula alada bilateral leve, mais visível no lado esquerdo

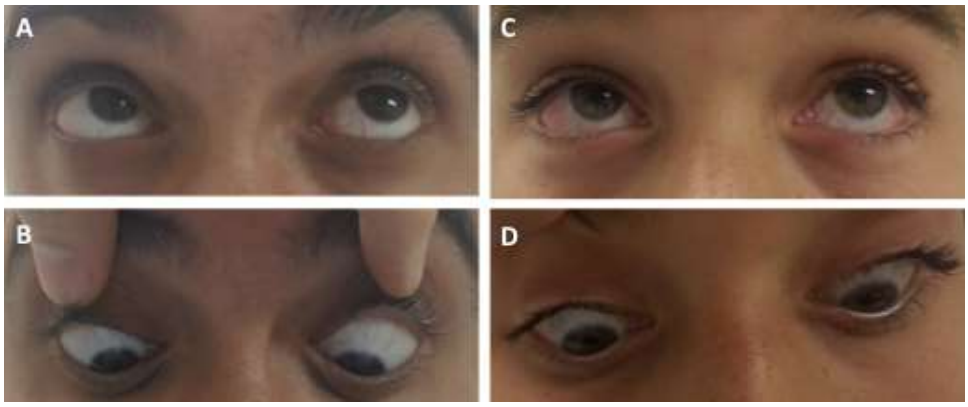

Figura 12 - Preservação relativa da movimentação vertical do olhar nos pacientes 32 (A e B) e 18 (C e D)

4.8 Aspectos Clínicos dos Pacientes *COL13A1*

Quatro pacientes, de três diferentes famílias, foram classificados como SMC relacionada ao gene *COL13A1,* por apresentarem variantes provavelmente patogênicas em homozigose no gene e um quadro clínico compatível. Nenhuma das variantes constam em bancos de dados de variantes e foram consideradas novas.

Três destes pacientes foram publicados em uma colaboração do nosso grupo em um estudo internacional que caracterizou clinicamente SMC por *COL13A1*[45] (Anexo E).

As Figura 13 mostra características de pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *COL13A1*. A Tabela 8 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes com mutação em *COL13A1*. A Tabela 9 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

Tabela 8 - Principais achados clínicos dos pacientes *COL13A1*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Mutações em COL13A1
8/12	17/M	+	+	+/+/-	+	+	-	+	+	c.833delC/ c.833delC
23/19	7/F	+	+	-/-/-	+	-	-	-	+	c.486delT/ c.486delT
37/32	28/M	+	-	-/-/-	+	-	-	-	+	c.549+5G>A/ c.549+5G>A
38/32	18/F	+	-	+/+/-	+	-	-	-	+	c.549+5G>A/ c.549+5G>A

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 9 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes *COL13A1*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/ AT2	CPKN	Mutações em COL13A1
8/12	17/M	-	SD	-	+	SD	+/-	+	c.833delC / c.833delC;
23/19	7/F	-	SD	SD	+	SD	SD	+	c.486delT/ c.486delT
37/32	28/M	-	SD	SD	-	+	+/-	+	c.549+5G>A/ c.549+5G>A
38/32	18/F	-	SD	SD	-	SD	SD	+	c.549+5G>A/ c.549+5G>A

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

Figura 13 - Ptose palpebral bilateral nos pacientes 23 (A), 36 (B) e 37 (C). Em C, paciente tenta elevar os olhos para cima, demonstrando acometimento seletivo dos músculos reto superiores. D e E mostram escoliose nos pacientes 36 (D) e 37 (E)

4.9 Aspectos Clínicos dos Pacientes *DOK7*

Três pacientes de diferentes famílias foram diagnosticados como SMC devido a mutações no gene *DOK7,* detectadas por sequenciamento sanger do exon 7 do gene. Dois pacientes (13 e 47) apresentaram a mutação recorrente c.1124_1127dupTGCC em homozigose, e o outro (paciente 51) apresentou ela em associação em trans com outra mutação. As mutações encontradas já foram descritas previamente como patogênicas. Todos estes pacientes então foram considerados como confirmados. A Tabela 10 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *DOK7*. A Tabela 11 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos. A Figura 14 mostra características dos pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *DOK7*.

Tabela 10 - Principais achados clínicos dos pacientes *DOK7*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Mutações em DOK7
13/9	18/F	+	+	-/-/-	+	+	-	+	+	c.1124_1127dupTGCC/ c.1124_1127dupTGCC
47/39	39/M	+	+	-/-/-	-	+	+	-	-	c.1124_1127dupTGCC/ c.1124_1127dupTGCC
51/42	24/F	+	+	-/-/-	+	+	+	-	+	c.1124_1127dupTGCC/ c.1357_1370del14

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 11 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes *DOK7*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/ AT2	CPKN	Mutações em DOK7
13/9	18/F	-	SD	SD	-	SD	+/-	+	c.1124_1127dupTGCC/ c.1124_1127dupTGCC
47/39	39/M	-	SD	+	+	+	+/-	-	c.1124_1127dupTGCC/ c.1124_1127dupTGCC
51/42	24/F	-	+	-	+	-	SD	+	c.1124_1127dupTGCC/ c.1357_1370del14

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

Figura 14 - Achados clínicos de pacientes *DOK7.* Escápula alada na paciente 13 (A) e hiperlordose nos pacientes 50 (B) e 46 (C)

4.10 Aspectos Clínicos dos Pacientes *COLQ*

Os pacientes irmãos 29 e 30 da família 25, e o paciente 61 da família 52 da foram diagnosticados como SMC devido a mutação bialélica no gene *COLQ.* Eles foram considerados como confirmados, devido a quadro clínico compatível, e a provável patogenicidade das mutações. Os pacientes da família 25 abrigavam a mutação intrônica em sítio doador de splicing c.219+1G>C em homozigose, já descrita como patogênica. O paciente 61 da família 52 abrigava mesma mutação c.219+1G>C em heterozigose, em associação com c.158insC (p.leu53profs*81). A Tabela 12 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *COLQ*. A Tabela 13 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos. As Figuras 15 e 16 mostram características clínicas e eletrofisiológicas dos pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *COLQ*.

Tabela 12 - Principais achados clínicos dos pacientes *COLQ*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Mutações em *COLQ*
29/25	41/F	+	+	+/+/+	+	+	-	+	+	c.219+1G>C + c.219+1G>C
30/25	34/M	+	+	+/+/+	+	+	+	-	+	c.219+1G>C + c.219+1G>C
61/52	49/M	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	c.219+1G>C + c.158insC

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 13 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes *COLQ*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/ AT2	CPKN	Mutações em *COLQ*
29/25	41/F	-	+	SD	+	SD	+/+	+	c.219+1G>C + c.219+1G>C
30/25	34/M	-	SD	SD	+	+	SD	+	c.219+1G>C + c.219+1G>C
61/52	49/M	-	+	+	+	SD	+/-	+	c.219+1G>C + c.158insC

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

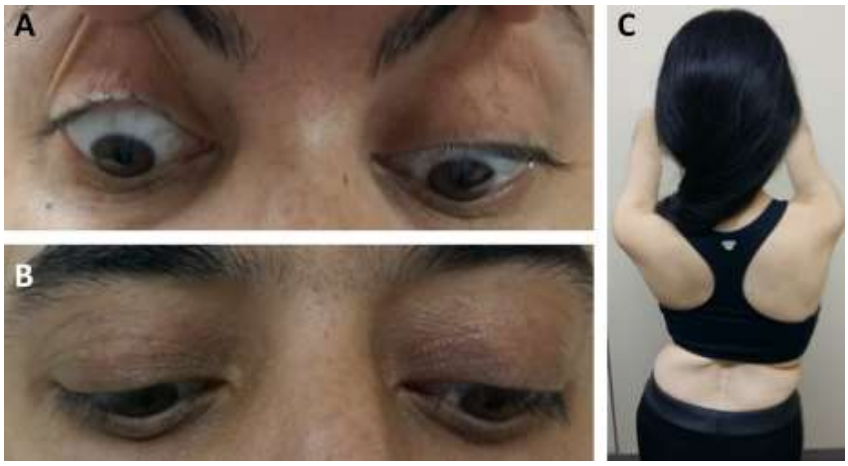

Figura 15 - Relativa preservação dos músculos reto inferiores dos pacientes 29 (A) e 28 (B). C. Escoliose da paciente 29

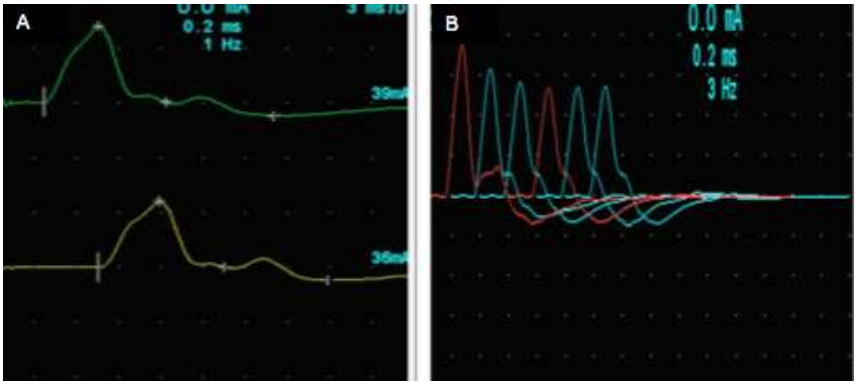

Figura 16 - A. Estudo de condução nervosa de nervo ulnar na paciente 29, mostrando duplo potencial após um único estímulo. B. Teste de estímulo repetitivo a 3Hz na mesma paciente, mostrando decremento >10%, o qual é visto no potencial principal e no potencial duplicado

4.11 Aspectos Clínicos das Pacientes *GFPT1*

Duas pacientes de diferentes famílias (pacientes 78 e 79, das famílias 67 e 68) foram diagnosticadas como SMC devido a mutações bi-alélicas no gene *GFPT1* (ambas em provável heterozigose composta), detectadas em sequenciamento de exoma. Nenhuma das variantes constam em bancos de dados de variantes e foram consideradas novas. Os dois casos então foram consideradas como casos confirmados, uma vez que o quadro clínico deles são típicos (inclusive com agregados tubulares em biópsia de músculo). A Tabela 14 mostra sumariamente os principais dados clínicos das pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *GFPT1*. A Tabela 15 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos. A Figura 17 mostra características dos pacientes com diagnóstico confirmado de SMC por mutação em *GFPT1*, e a Figura 18 mostra achados histológicos da paciente 78.

Tabela 14 - Principais achados clínicos dos pacientes *GFPT1*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Mutações em *GFPT1*
78/67	23/F	+	+	-/-/-	-	-	-	-	+	c.652T>G / c.275C>T
79/68	33/F	+	+	-/-/-	-	-	-	-	+	c.1375G>A / c.67C>G

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 15 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes *GFPT1*

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/ AT2	CPKN	Mutações em *GFPT1*
78/67	23/F	+	SD	SD	+	SD	+/-	+	c.1124_1127dupTGCC/ c.1124_1127dupTGCC
79/68	33/F	+	SD	SD	+	+	+/-	-	c.1124_1127dupTGCC/ c.1357_1370del14

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

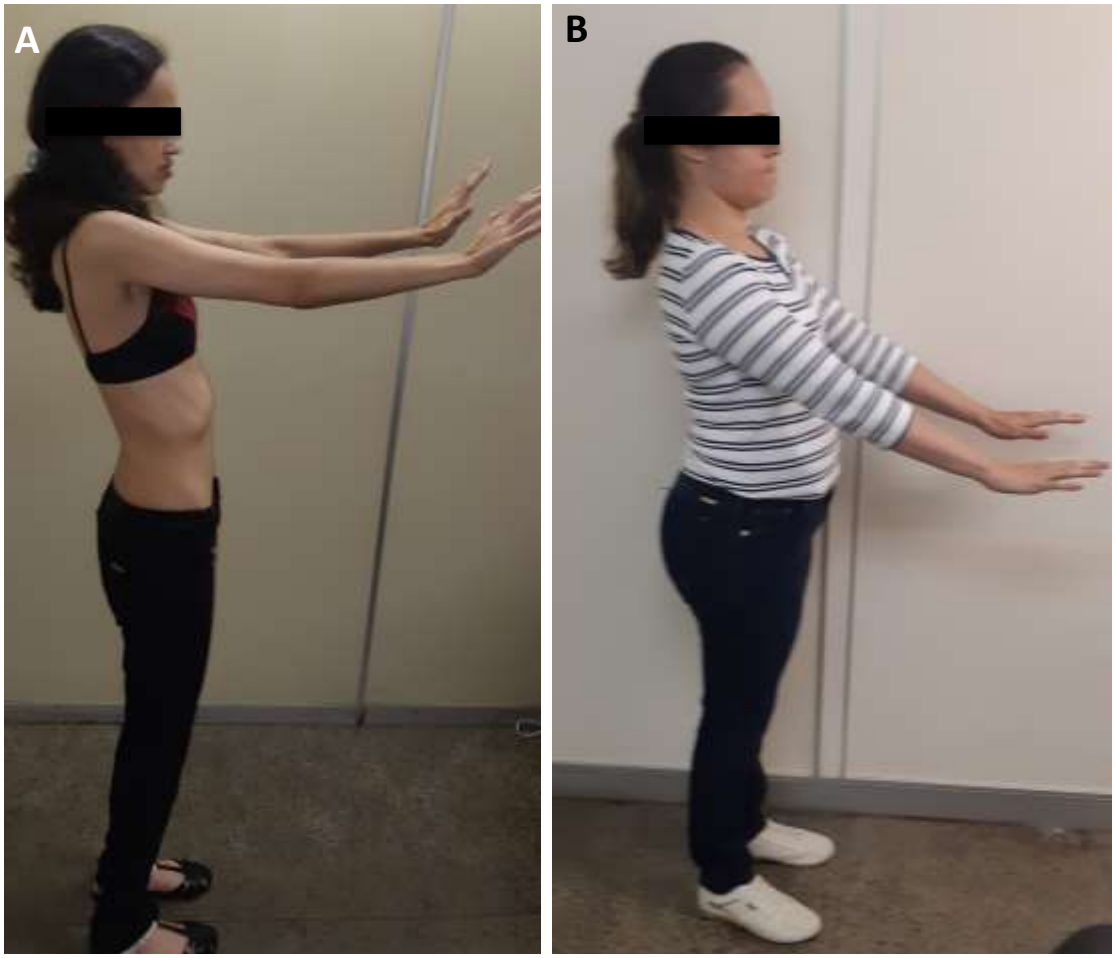

Figura 17 - Achados clínicos das pacientes *GFPT1.* Dificuldade de elevar os membros superiores com ângulo acima de 90 graus com o ombro. Pacientes 78 (A) e 79 (B)

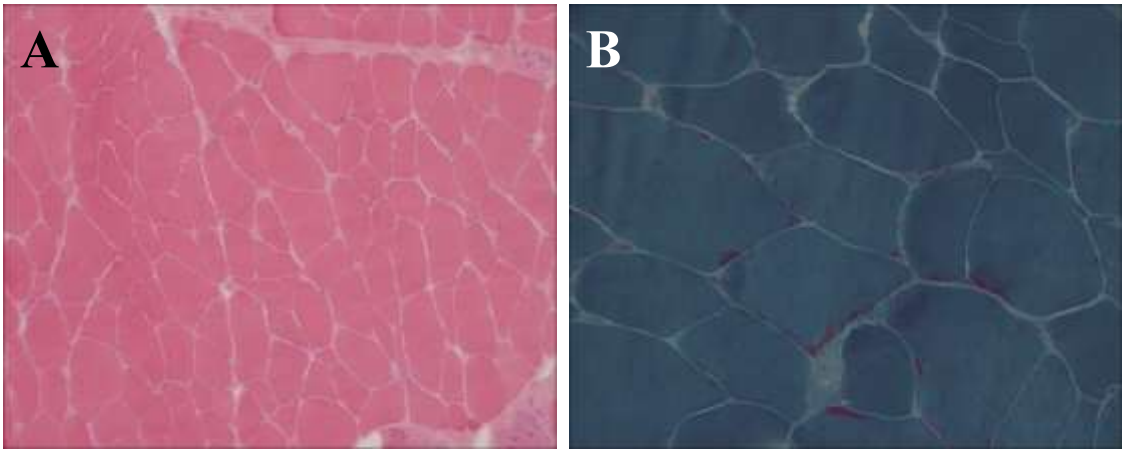

Figura 18 - Achados histológicos da biópsia de músculo da paciente 78 da família 67, com mutação no gene GFPT1. Na coloração HE (A), observa-se aumento da variabilidade das fibras musculares, grau moderado de aumento do tecido conjuntivo endomisial, e perda do formato poligonal típico das fibras musculares. Na coloração Gömöri (B), observa-se agregados tubulares nas periferias das fibras musculares

4.12 Aspectos Clínicos da Paciente *GMPPB*

A paciente 63, da família 54, é uma paciente do sexo feminino de 40 anos de idade com origem étnica que sugere ascendência portuguesa e espanhola, sem história de consanguinidade na família, que apresentou as mutações c.95C>T (p.Pro32Leu) e c.79G>C (p.Asp27His) no gene *GMPPB* em heterozigose. Ambas variantes foram detectadas no sequenciamento de todo o exoma. As variantes foram classificadas como provavelmente patogênicas, e, como o quadro clínico apresentado pela paciente era compatível, consideramos o caso como confirmado.

Paciente sem relato de alterações gestacionais, com histórico de pé torto congênito, sem outras alterações neonatais. Evoluiu com marcos motores normais, sem alterações do desenvolvimento neuropsicomotor. Por volta dos 10

anos de idade, paciente percebeu dificuldade para acompanhar seus pares nas atividades físicas. Desde então sempre cansava mais rápido que as outras pessoas, fosse para uma caminhada curta, ou para outra atividade física leve. Aos 36 anos, durante sua primeira gravidez, apresentou importante piora da força em membros inferiores. Começou a precisar de apoio para levantar da posição de sentada, sendo que para levantar do chão já precisava de apoio antes da gestação. Com o passar dos anos, a fraqueza em membros inferiores foi piorando lentamente, e se iniciou fraqueza também de membros superiores. Aos 40 anos, quando foi avaliada para nosso estudo, apresentava fraqueza proximal nos 4 membros, pior em membros inferiores, sendo que sintomas ficavam mais intensos após manobras para provocar fatiga dos músculos (Figura 19). Não havia fraqueza de músculos óculo-cranianos, nem alterações cognitivas ou outra alteração neurológica. Eletroneuromiografia demonstrou decremento patológico com estímulo repetitivo a 3Hz, e estudo de fibra única evidenciou aumento patológico de jitter. Nível sérico de creatinofosfoquinase era de 1700, e biópsia muscular não foi realizada. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com melhora substancial dos sintomas. Com tratamento paciente manteve boa funcionalidade, com restrição apenas para correr ou para realizar exercícios prolongados. A Tabela 16 mostra sumariamente os principais dados clínicos da paciente e a Tabela 17 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

Figura 19 - Achados clínicos da paciente 63, da família 54, com mutação no gene *GMPPB.* Dificuldade de elevar os membros superiores com ângulo acima de 90 graus com o ombro

4.13 Aspectos Clínicos da Paciente *CHAT*

A paciente 46, da família 38, é uma paciente do sexo feminino de 3 anos de idade com origem étnica que sugere ascendência italiana (paterna) e ameríndia nativa (materna), sem história de consanguinidade na família, que apresentou as mutações c.1964T>C e c.1145A>G no gene *CHAT* em heterozigose. Ambas variantes foram detectadas no sequenciamento de todo o exoma. Análise de DNA dos familiares confirmou heterozigose composta.

A paciente é filha única do casal, com histórico de gestação sem intercorrências. Imediatamente após o parto, a paciente foi internada em unidade de terapia intensiva, onde permaneceu em ventilação mecânica por um mês e de onde recebeu alta apenas aos dois meses de idade, já com gastrostomia e traqueostomia para utilização de BiPAP. Logo nos primeiros dias de vida foi constatado pé torto congênito, fraqueza generalizada, oftalmoparesia, ptose palpebral e fraqueza dos músculos respiratórios (Figura 20). Paciente evoluiu com marcos motores atrasados, dificuldades de amamentar (com necessidade

de gastrostomia), hipotonia neonatal e apresentando episódios diários de apneia, principalmente durante a noite, que demandava uso de BiPAP contínuo. Os sintomas eram contínuos, mas costumavam piorar após algum esforço, caracterizando a fatigabilidade. Após infecções, os sintomas ficavam mais intensos por algumas semanas. Ao longo dos meses, houve certa melhora do quadro clínico e os episódios de apneia tornaram-se menos frequentes, de forma que a assistência ventilatória começou a ser necessária somente a noite (quando paciente estava sem fatores descompensatórios, como infecção, por exemplo). Aos 3 anos de idade a paciente foi avaliada para nosso estudo, quando foi constatado fraqueza apendicular e axial, oftalmoparesia global, ptose palpebral, fraqueza da musculatura da mastigação e mímica, disfagia, disartria e disfonia. Foi ainda observado palato alto e malformações dentárias. Até a última avaliação (5 anos de idade) paciente ainda não havia adquirido marcha. A primeira eletroneuromiografia com estimulação nervosa repetitiva a 3 Hz, foi normal. Devido à suspeita diagnóstica, foi realizada estimulação repetitiva a 10HZ por 2 minutos e então se observou resposta decremental (92%). Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com discreta melhora do quadro, observado principalmente pela redução de tempo necessário com BiPAP. Tentado associar salbutamol, que levou a certa melhora dos sintomas, mas com efeito transitório de apenas 3 a 4 meses, e foi descontinuado. Paciente manteve funcionalidade ruim, com uso diário de BiPAP aproximadamente 12h/dia, em uso de gastrostomia para se alimentar, sem conseguir manter-se de pé sem apoio. A Tabela 16 mostra sumariamente os principais dados clínicos da paciente e a tabela 17 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

Figura 20 - Fotos da paciente 46, da família 38, mostrando traqueostomia (A), ptose palpebral bilateral (B) e malformações dentárias e palato ogival (C)

4.14 Aspectos Clínicos do Paciente *CHRNA1*

O paciente 60, da família 51, é um paciente do sexo masculino de 6 anos de idade com origem étnica que sugere ascendência africana e portuguesa, filho de pais primos de primeiro grau, que apresentou a mutação c.1396G>A no gene *CHRNA1* em homozigose. Essa variante foi detectada no sequenciamento de todo o exoma. Paciente foi fruto de gravidez sem intercorrências, apresentou, imediatamente após o parto necessidade de intubação orotraqueal devido a insuficiência respiratória e foi admitido na UTI neonatal, onde ele ficou por um ano e meio. Recebeu alta com gastrostomia e traqueostomia, com suporte contínuo de BiPAP. Apesar de ter melhorado gradualmente com o passar dos anos, ele permaneceu gravemente debilitado, nunca tendo adquirido sustento da cabeça ou a capacidade de se sentar. Aos 6 anos, quando avaliado para nosso estudo, foi constatado fraqueza nos 4 membros, com predomínio proximal, ptose palpebral bilateral, oftalmoplegia global, ausência de expressão facial, palato alto e hipotonia acentuada sem contraturas (Figura 20). Eletroneuromiografia mostrou decremento patológico ao estímulo repetitivo a 3Hz. Além disso, a eletromiografia de fibra única mostrou aumento do jitter na

contração voluntária do músculo orbicular do olho. Seu nível sérico de creatinofosfoquinase sempre permaneceu dentro da faixa normal. Biópsia muscular realizada em 10 meses mostrou predominância marcada e atrofia de fibras do tipo 2 sem outras alterações (Figura 21). O paciente foi então tratado com piridostigmina e teve melhora quase imediata no movimento dos membros, e melhora gradual na função ventilatória, reduzindo o suporte ao BiPAP ao ponto de se tornar necessário apenas à noite. Mesmo com tratamento, paciente manteve funcionalidade ruim, com uso diário de BiPAP aproximadamente 8h/dia, com necessidade de gastrostomia para se alimentar, sem conseguir manter-se sentado com apoio.

Este caso foi publicado como relato de caso pelo nosso grupo, pela raridade de mutações bi-alélicas em *CHRNA1*, e pela dificuldade diagnóstica diante do quadro inicial[82] (Anexo F).

A Tabela 16 mostra sumariamente os principais dados clínicos da paciente e a Tabela 17 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

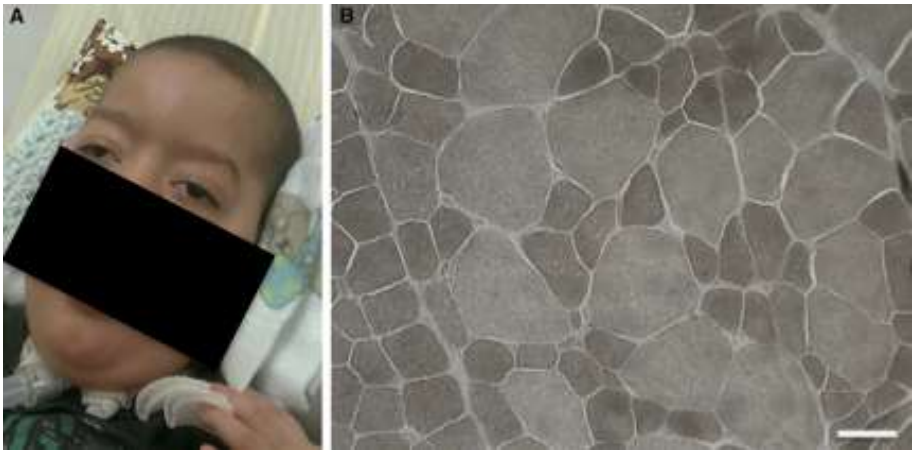

Figura 21 - Foto do paciente 60 da família 51 evidenciando ptose acentuada e fraqueza facial, além de atrofia proeminente da testa e temporal. Suporte respiratório via traqueostomia também pode ser visto (A). A biópsia muscular mostra predominância acentuada e atrofia das fibras do tipo 2 (9.4, barra branca = 50 μm) (B)

4.15 Aspectos Clínicos do Paciente *SCN4A*

A paciente 16, da família 12 é uma menina de 3 anos com origem étnica desconhecida, sem histórico de consanguinidade na família, que apresentou as variantes c.5156C>G + c.486_487insGGCG no gene *SCN4A,* detectadas no sequenciamento de todo exoma. Não houve registro de alterações durante a vida fetal ou no período neonatal da paciente, que evoluiu sem atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. No oitavo mês de vida, mãe observou ptose palpebral, oftalmoparesia, fraqueza do pescoço, disartria e disfagia. Desde então paciente apresentou episódios repetitivos de fraqueza severa e insuficiência respiratória, geralmente desencadeada por infecções respiratórias, por vezes necessitando ventilação mecânica. Aos 3 anos de idade, quando foi avaliada para nosso estudo, foi constatado ptose palpebral bilateral (Figura 22), oftalmoparesia global poupando músculos reto superiores, fraqueza do pescoço, músculos mastigatórios e face, disartria e disfagia. Eletroneuromiografia mostrou resposta decremental à estimulação repetitiva a 3 Hz. Nível sérico de

creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular não foi realizada. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com melhora dos sintomas. Como mesmo em uso e dose máxima tolerada de piridostigmina (7 mg/kg-dia), ainda havia sintomas, efedrina foi associada, levando a melhora adicional. Com tratamento paciente manteve boa funcionalidade, com diminuição importante da frequência dos episódios de descompensação, e com restrição em suas atividades físicas apenas para correr. A Tabela 16 mostra sumariamente os principais dados clínicos da paciente e a Tabela 17 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

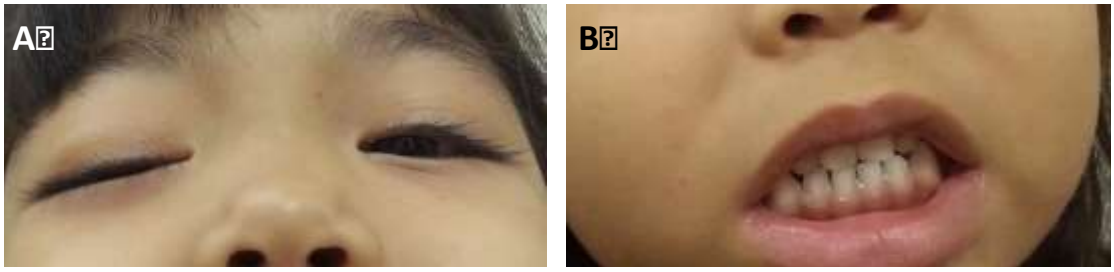

Figura 22 - Paciente 16, da família 12. Ptose palpebral bilateral na paciente (A); fraqueza facial (B)

Tabela 16 - Principais achados clínicos de pacientes SMC

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Gene alterado
16/12	3/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	*SCN4A*
46/38	3/F	+	+	+/-/-	+	+	+	+	-	*CHAT*
60/51	6/M	+	+	+/-/-	+	+	+	+	-	*CHRNA1*
63/54	40/F	-	+	-/-/-	-	+	-	-	+	*GMPPB*

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 17 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos de pacientes SMC

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/ AT2	CPKN	Gene alterado
16/12	3/F	+	+	-	+	SD	SD	+	*SCN4A*
46/38	3/F	+	SD	+	-	SD	SD	-	*CHAT*
60/51	6/M	+	SD	-	+	SD	+/+	+	*CHRNA1*
63/54	40/F	-	SD	+	+	+	SD	-	*GMPPB*

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

4.16 Aspectos Clínicos dos Pacientes *CHRNE* Prováveis

Quatro pacientes foram classificados como SMC provavelmente relacionada ao gene *CHRNE*, por apresentarem quadro clínico compatível e apresentarem mutação no gene *CHRNE*, mas não comprovadamente de forma bi-alélica.

Família 2

Os irmãos identificados como 4 e 5, da família 2, são dois casos de SMC, filhos do mesmo casal não consanguíneo. Relatos da família sugeriam ancestralidade em parte italiana (materna) e portuguesa (paterna). Os dois pacientes abrigavam a mutação c.393C>G em heterozigose no gene *CHRNE*, detectada por sequenciamento de todo exoma. Essa variante foi encontrada na mãe, mas não no pai. Nenhuma outra variante possivelmente patogênica foi encontrada no gene *CHRNE* desses pacientes.

A paciente 5 é a primeira filha da família, que teve gestação sem intercorrências e nasceu a termo. Desenvolvimento e crescimento foram normais até o terceiro mês, quando os pais observaram ptose palpebral bilateral, que

variava de intensidade de acordo com período do dia (ficando mais evidente após longos períodos de olhos abertos). Marcos motores foram adequadamente adquiridos, mas quando começou a deambular, apresentou quedas muito frequentes, e após alguns meses, oftalmoparesia e fraqueza para mastigar foram notados. Aos 20 anos de idade, quando foi avaliada para nosso estudo, foram observados ptose palpebral, oftalmoparesia global com relativa preservação da versão para baixo, fraqueza facial e dos músculos da mastigação, e fraqueza leve nos 4 membros, sem predomínio em relação proximal/distal. Não foram encontrados contraturas ou dismorfismo. Os sintomas eram todos fatigáveis, e flutuavam. Eletroneuromiografia demonstrou decremento patológico com estímulo repetitivo a 3Hz. Além disso, eletromiografia de fibra única foi realizada e revelou jitter aumentado no músculo orbicular do olho. Biópsia muscular mostrou alterações miopáticas inespecíficas (atrofia seletiva de fibras tipo II). Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com melhora parcial dos sintomas. Após aumento da dose até o máximo tolerado (300mg/dia, nesse caso), foi optado por associar salbutamol, uma vez que ainda havia sintomas que restringiam sua funcionalidade. Houve melhora adicional dos sintomas após introdução do salbutamol. Com tratamento paciente manteve boa funcionalidade, com restrição apenas para correr, e necessidade de 1 apoio para subir lances de escada.

O paciente 4 é segundo filho da família, que também teve gestação sem intercorrências e nasceu a termo. Desenvolvimento e crescimento foram normais até o quarto mês, quando pais observaram ptose palpebral bilateral, que variava de intensidade de acordo com o período do dia, parecido com o que foi observado na primeira filha. Marcos motores foram adequadamente adquiridos,

mas quando começou a deambular, apresentou quedas muito frequentes, e após alguns meses, oftalmoparesia e fraqueza para mastigar foram notados. Aos 13 anos de idade, quando foi avaliado para nosso estudo, foram observados ptose palpebral (Figura 23), oftalmoparesia global com relativa preservação da versão para baixo, fraqueza dos músculos da mastigação, e fraqueza discreta nos 4 membros, de predomínio proximal. Diferentemente da irmã, não havia fraqueza facial. Os sintomas eram todos fatigáveis, e flutuavam. Discreta escápula alada foi notada, mas nenhuma contratura ou dismorfismo. De maneira geral, os sintomas eram menos evidentes do que na primeira filha. Eletroneuromiografia demonstrou decremento patológico com estímulo repetitivo a 3Hz. Além disso, eletromiografia de fibra única foi realizada e revelou jitter aumentado no músculo orbicular do olho. Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular não foi realizada. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com melhora dos sintomas. Com tratamento paciente manteve boa funcionalidade, sem restrição para nenhuma atividade cotidiana.

Família 5

O paciente 9, da família 5, é filho de pais não consanguíneos, que abriga a mutação c.130dupG em heterozigose no gene *CHRNE*, detectada no sequenciamento Sanger do exon 2 do gene. Apesar de toda região codificadora do gene *CHRNE* ter sido sequenciada (por método Sanger), nenhuma outra variante possivelmente patogênica foi encontrada. Relatos do paciente sugeriam ancestralidade em parte Africana (paterna). Não houve registros de quaisquer alterações na gestação ou período perinatal. Desenvolvimento e crescimento foram normais até o décimo oitavo mês, quando pais observaram quedas

frequentes associadas a ptose palpebral, dificuldade para deglutir e para falar. Após alguns meses perdeu capacidade de marcha, que havia adquirido com 1 ano de idade, apresentando recuperação da marcha após cerca de um ano. Desde então nunca teve funcionalidade normal, sempre com dificuldade de acompanhar seus pares em atividades físicas e com fraqueza leve nos membros. Sempre houve fatigabilidade e flutuação dos sintomas. Aos 28 anos apresentou evento único de exacerbação dos sintomas após intenso exercício físico, durante a qual teve que ser internado, mas não necessitou ventilação mecânica. Aos 32 anos de idade, quando foi avaliado para nosso estudo, foram observados ptose palpebral, oftalmoparesia global com relativa preservação da versão para baixo, fraqueza facial e fraqueza leve nos 4 membros, de predomínio proximal. Não foram vistos contraturas ou dismorfismos. Dados de eletroneuromiografia mostravam decremento a estímulo repetitivo. Biópsia muscular mostrou alterações miopáticas inespecíficas (atrofia seletiva de fibras tipo II). Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com melhora dos sintomas. Com tratamento paciente manteve boa funcionalidade, sem restrição para deambulação, conseguindo subir escadas sem apoio, mas sem capacidade de correr.

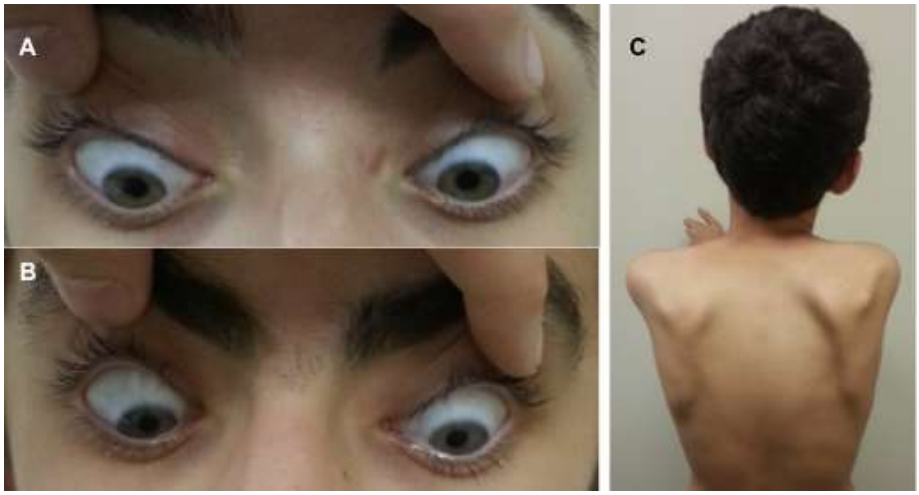

Figura 23 - Pacientes da família 2. Oftalmoparesia parcial com preservação, ao menos relativa dos músculos reto inferiores nos pacientes 4 (A) e 5 (B). C. Discreta escápula alada bilateral no paciente 4

Família 23

O paciente 27, da família 23, é filho de pais não consanguíneos, que abriga a mutação c.901G>A em heterozigose no gene *CHRNE.* Apesar de toda região codificadora do gene *CHRNE* ter sido analisada (por análise de todo exoma), nenhuma outra variante possivelmente patogênica foi encontrada. Relatos da família sugeriam ancestralidade italiana (paterna e materna). Não houve registros de quaisquer alterações na gestação ou período perinatal. Paciente evoluiu com hipotonia neonatal e leve atraso dos marcos motores. Aos 3 anos de idade, pais observaram ptose palpebral, dificuldade para deglutir e fraqueza generalizada. Havia fatigabilidade e flutuação dos sintomas. Desde então, episódios de intensa exacerbação dos sintomas, necessitando internação hospitalar, ocorreram com frequência aproximada de 1 vez ao ano, todos precipitados por infecção respiratória. Aos 21 anos de idade, quando foi avaliado para nosso estudo, foram observados ptose palpebral, sem oftalmoparesia ou fraqueza facial, mas com discreta fraqueza nos 4 membros, sem predomínio em relação proximal/distal. Não foram vistos contraturas ou dismorfismos. Eletroneuromiografia demonstrou decremento patológico com estímulo repetitivo a 3Hz. Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular não foi realizada. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com melhora parcial dos sintomas. Após aumento da dose até o máximo tolerado (360mg/dia, nesse caso), foi optado por associar efedrina, uma vez que ainda havia sintomas que

restringiam sua funcionalidade. Houve melhora adicional dos sintomas após introdução de efedrina. Com tratamento paciente manteve boa funcionalidade, com restrição apenas para correr.

A Tabela 18 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes considerados como prováveis e a Tabela 19 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

4.17 Aspectos Clínicos do Paciente *RAPSN* Provável

A paciente 70, da família 60, é filha de pais não consanguíneos, que abriga a mutação c.233A>T(p.Asp78Val) em heterozigose no gene *RAPSN,* que foi identificada por exame de sequenciamento de todo exoma. Uma outra variante de significado incerto foi encontrada, mas com pouca probabilidade de ser patogênica por ser sinônima (c.1194C>T; p.Ser398Ser). Dessa forma consideramos que o paciente apresenta uma variante patogênica, por isso o classificamos como provável, uma vez que o quadro clínico é compatível. Relatos da família sugeriam ancestralidade italiana materna. Não houve registros de quaisquer alterações na gestação ou período perinatal. Paciente evoluiu com marcos motores normais, sem alterações do desenvolvimento neuropsicomotor. Por volta de 1 ano de idade, pais observaram ptose palpebral, inicialmente a esquerda, mas depois de forma alternada nos dois olhos. Por volta de 1 ano e meio apresentou quadro de crise miastênica, com insuficiência respiratória e necessidade de ventilação mecânica, episódio esse desencadeado por infecção de vias aéreas superiores. Desde então com dificuldade para deambular, com fatigabilidade precoce e quedas frequentes. Episódios de crise miastênica se repetiram de forma frequente, por cerca de 2 a 3 vezes ao ano. Ao exame físico havia ptose palpebral, com alteração de motricidade ocular poupando olhar para baixo (Figura 24). Havia também

fraqueza facial, sintomas bulbares com disartria e disfonia, além de fraqueza para mastigação. Fraqueza nos 4 membros só foi percebida após manobras para induzir fatigabilidade. Eletroneuromiografia não demonstrou decremento patológico com estímulo repetitivo a 3Hz. Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular não foi realizada. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com melhora parcial dos sintomas. Após aumento da dose até o máximo tolerado (6 mg/kg/dia, nesse caso), foi optado por associar salbutamol, uma vez que ainda havia sintomas que restringiam sua funcionalidade. Houve melhora adicional dos sintomas após introdução do salbutamol. Com tratamento paciente manteve boa funcionalidade, com restrição apenas para correr ou para realizar exercícios prolongados. Não houve mais episódios de crises miastênicas até o dia da última consulta (aos 6 anos de idade). A tabela 18 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes considerados como prováveis e a tabela 19 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

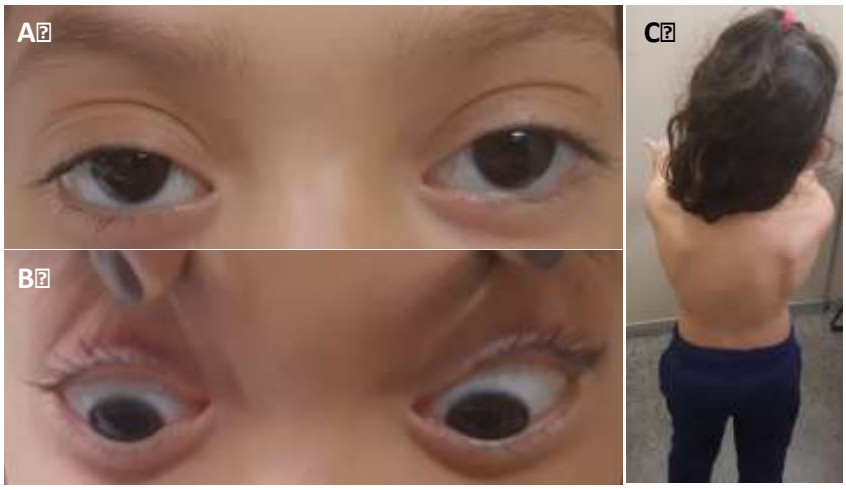

Figura 24 - Paciente 70 da família 60. Ptose palpebral bilateral (A) oftalmoparesia parcial com preservação, ao menos relativa dos músculos reto inferiores (B). C. Discreta escápula alada bilateral

4.18 Aspectos Clínicos do Paciente *CHRND* Provável

O paciente 36, da família 31, é um paciente do sexo masculino de 12 anos de idade com origem étnica desconhecida, sem história de consanguinidade na família, que apresentou as mutações intrônicas c.821-448G>C + c.821-448G>C no gene *CHRND* em heterozigose composta. Ambas variantes foram detectadas no sequenciamento de todo o exoma, e foram preditas de interferir em splicing, apesar de suas localizações mais profundas. Análise de DNA dos familiares confirmou heterozigose composta. Pelo fato de se tratar de variantes intrônicas e pelo quadro clínico de síndrome miastênica congênita por deficiência de receptor por mutação em *CHRND* não ser muito bem definido, consideramos este caso como provável.

O paciente iniciou, por volta de 1 ano e meio de idade, quadro de ptose palpebral assimétrica, percebida pelos pais. Sintomas flutuavam, sendo em alguns dias mais ou menos intensos. Com infecção sempre havia piora. Por volta dos 3 anos foi percebido estrabismo divergente em olho esquerdo. Paciente e familiares negavam fadiga, sintomas bulbares e apendiculares. Aos 12 anos, quando foi avaliado para o estudo, paciente apresentava ptose palpebral, alteração de motricidade ocular extrínseca com preservação do olhar para baixo e fraqueza facial (Figura 25). Não havia alteração de força em membros mesmo após manobras para induzir fadiga e nem qualquer outra alteração neurológica. Eletroneuromiografia não demonstrou decremento patológico com estímulo repetitivo a 3Hz, mas estudo de fibra única evidenciou aumento patológico de jitter. Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular não foi realizada. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com melhora parcial dos sintomas, principalmente da ptose palpebral. Com tratamento paciente manteve

boa funcionalidade, sem restrições para realização das atividades do dia a dia, e nem mesmo para atividade física. A tabela 18 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes considerados como prováveis e a tabela 19 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

Figura 25 - Paciente 36, da família 31, com ptose palpebral assimétrica (A) e preservação do olhar para baixo (B)

4.19 Aspectos Clínicos do Paciente *SCN4A* Provável

A paciente 59, da família 50, é uma mulher de 50 anos com origem étnica desconhecida, sem histórico de consanguinidade na família, que apresentou as variantes c.692C>T + c.5511G>C no gene *SCN4A,* detectadas no sequenciamento de todo exoma. Análise dos familiares (pelo mesmo método) confirmou heterozigose composta.

Não houve registro de alterações durante a vida fetal ou no período perinatal da paciente. No entanto, ela apresentou quadro de hipotonia neonatal, dificuldades na amamentação e atraso dos marcos motores. Desde o período neonatal, pais observaram sintomas flutuantes de fraqueza nos 4 membros e dificuldade para se alimentar. Ao longo dos anos o quadro evoluiu com lenta progressão, mas sem episódios de importante exacerbação. Aos 50 anos, quando foi avaliada para nosso estudo, foi constatado fraqueza nos membros inferiores, músculos axiais (principalmente pescoço e abdome) e mastigatórios,

mas sem oftalmoparesia ou ptose palpebral. Foi ainda visto hiperlordose lombar e palato ogival. Eletroneuromiografia não mostrou resposta decremental à estimulação repetitiva a 3 Hz, apesar de 3 nervos serem testados (facial, acessório e ulnar), mas alterações miopáticas foram vistas. Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular mostrou alterações miopáticas, com centralização nuclear, aumento de tecido conjuntivo e da variabilidade das fibras, além de presença de massas intra-citoplasmáticas. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, e não foi observado qualquer resposta. Então foi introduzido salbutamol, com melhora parcial da fraqueza em membros inferiores. Com tratamento paciente manteve funcionalidade regular, conseguindo subir degraus apenas com 2 apoios, e com deambulação restrita a 30 metros. A tabela 18 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes considerados como prováveis e a tabela 19 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

Tabela 18 - Principais achados clínicos de pacientes classificados como provável SMC

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Gene provavelmente alterado
4/2	13/M	+	+	+/+/+	+	+	-	-	+	*CHRNE*
5/2	20/F	+	+	+/+/+	+	+	-	+	+	*CHRNE*
9/5	32/M	+	+	+/+/-	+	+	+	+	+	*CHRNE*
27/23	21/M	-	+	-/-/-	+	+	+	-	+	*CHRNE*
36/31	12/M	+	+	+/+/+	+	-	-	+	+	*CHRND*
59/50	50/F	+	+	-/-/-	-	+	-	-	-	*SCN4A*
70/60	6/F	+	+	+/+/+	+	+	+	+	+	RAPSN

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 19 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos de pacientes provável SMC

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/ AT2	CPKN	Gene provavelmente alterado
4/2	13/M	+	SD	SD	+	+	SD	+	*CHRNE*
5/2	20/F	+	SD	+	+	+	+/+	+	*CHRNE*
9/5	32/M	+	SD	SD	+	SD	+/+	+	*CHRNE*
27/23	21/M	+	+	SD	+	SD	-	+	*CHRNE*
36/31	12/M	+	SD	SD	-	+	SD	+	*CHRND*
59/50	50/F	-	SD	+	-	-	+/-	+	*SCN4A*
70/60	6/F	+	SD	SD	-	SD	-	+	*RAPSN*

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

4.20 Aspectos Clínicos dos Pacientes não-SMC

Cinco pacientes, de cinco diferentes famílias, foram classificados como não-SMC, devido à presença de mutações provavelmente patogênicas em genes relacionados a outras síndromes. Em reanálise retrospectiva, foi verificado que os fenótipos condiziam com o diagnóstico molecular nesses casos. Todas essas variantes foram detectadas no sequenciamento de todo exoma. A Tabela 20 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes considerados como não-SMC e a Tabela 21 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

Familia 10

Paciente 14, da família 10, é um paciente do sexo masculino de 5 anos de idade com origem étnica que sugere ascendência espanhola e portuguesa, filho de pais não consanguíneos, que apresentou a mutação c.5615G>A no gene *SCN8A* em heterozigose. Essa variante foi detectada no sequenciamento de todo o exoma, e análise de DNA dos pais mostrou ser uma variante *de novo*.

Mutações em heterozigose nesse gene estão relacionadas a epilepsia leve e ataxia[83,84].

Paciente com histórico de pouca movimentação fetal durante gestação, com antecedente de pé torto congênito, teve parto sem intercorrências. Paciente evoluiu com leve atraso dos marcos motores e hipotonia, e já nas primeiras semanas de vida mãe observou ptose palpebral assimétrica, que era fixa, com a característica de flutuar de acordo com o período do dia. Após alguns meses foi notado também leve disfagia. Com 3 anos de idade iniciou quadro de epilepsia, a qual foi facilmente controlada com carbamazepina. Nessa idade mãe percebeu dificuldade intelectual, o qual foi confirmado por teste neuropsicológico. Os sintomas se mantiveram estáveis ao longo dos anos, e aos 5 anos, quando foi avaliado, foi observado a discreta ptose palpebral assimétrica, associada a leve fraqueza da proximal nos 4 membros, hiperlordose, escápula alada e leve ataxia (Figura 26). Foram também observados leves dismorfismos (palato alto e face alongada). Não havia fraqueza facial ou de músculos mastigatórios. A eletroneuromiografia foi normal, e não mostrou resposta decremental após estímulo repetitivo a 3 Hz (com 3 nervos testados). Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular mostrou alterações miopáticas inespecíficas (atrofia seletiva de fibras tipo II). Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com o que não houve nenhum efeito e então foi suspenso. Paciente manteve boa funcionalidade, sem qualquer restrição para realizar atividades físicas.

Figura 26 - Alterações fenotípicas do paciente 14, da família 10. A. Ptose palpebral assimétrica. B. Hiperlordose lombar. C. Escápula alada bilateral

Família 17

Paciente 21, da família 17, é um paciente do sexo masculino de 17 anos de idade com origem étnica desconhecida, filho de pais primos de segundo grau, que apresentou a mutação c.278C>T no gene *DHCR7* em homozigose. Essa variante foi detectada no sequenciamento de todo o exoma. Mutações em homozigose nesse gene estão relacionadas a síndrome de Smith-Lemli-Opitz[85].

Paciente com histórico de gestação sem intercorrências, teve parto complicado por apresentação pélvica. Evoluiu com atraso dos marcos motores, dificuldade de sucção e hipotonia, e já nas primeiras semanas de vida mãe observou ptose palpebral bilateral, que era fixa, com flutuação de acordo com o

período do dia. No primeiro ano de vida foi diagnosticado surdez. Na infância constatou-se grau moderado de rebaixamento do nível de intelectual. Os sintomas se mantiveram estáveis ao longo dos anos, e aos 17 anos quando foi avaliado foi observado discreta ptose palpebral bilateral, discreta oftalmoparesia, retração de tendões aquileus, pé plano e sindactilia de 2º e 3º pododáctilos. Foram também observados leves dismorfismos, como palato alto, implantação baixa de orelhas, face alongada e língua escrotal (Figura 27), achados esses típicos da síndrome diagnosticada. Não havia fraqueza facial, de músculos mastigatórios ou apendiculares. A eletroneuromiografia mostrou alterações miopáticas, mas não mostrou resposta decremental após estímulo repetitivo a 3 Hz (com 3 nervos testados). Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular não mostrou alterações. Ressonância Magnética de crânio não mostrou nenhuma alteração. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com o que o paciente não apresentou nenhum efeito, e então o tratamento foi suspenso. Mesmo sem tratamento, paciente manteve boa funcionalidade, sem qualquer restrição para realizar atividades físicas.

Figura 27 - Alterações fenotípicas do paciente 21, da família 17. A. Ptose palpebral bilateral. B. Língua escrotal. C. Sindactilia de 2º e 3º pododáctilos

Família 21

Paciente 25, da família 10, é um paciente do sexo masculino de 35 anos de idade com origem étnica que sugere ascendência africana e italiana, filho de pais primos de primeiro grau, que apresentou a mutação c.679C>T no gene *LDB3* em homozigose. Essa variante foi detectada no sequenciamento de todo o exoma. Mutações nesse gene estão relacionadas a miopatia miofibrilar[86].

Paciente com histórico de gestação e parto sem intercorrências. Teve hipotonia neonatal, mas evoluiu sem atraso de marcos motores. Por volta dos 6 anos de idade iniciou quadro de ptose palpebral bilateral, disfagia e fraqueza para mastigação. Os sintomas se mantiveram estáveis ao longo dos anos, e aos 35 anos quando foi avaliado foi observado a discreta ptose palpebral bilateral, sem oftalmoparesia, fraqueza de musculatura do pescoço, face e da mastigação, além de disfagia (Figura 28). Foram também observados hipotrofia de musculatura de cintura escapular e hipotonia difusa. A eletroneuromiografia mostrou alterações miopáticas, mas não mostrou resposta decremental após estímulo repetitivo a 3 Hz (com 3 nervos testados). Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular mostrou alterações

miopáticas inespecíficas (atrofia seletiva de fibras tipo II). Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com o que a paciente não percebeu nenhum efeito. Mesmo sem tratamento, paciente manteve boa funcionalidade, sem qualquer restrição para realizar atividades físicas.

Família 42

Paciente 52, da família 42, é um paciente do sexo masculino de 24 anos de idade com origem étnica desconhecida, sem história de consanguinidade na família, que apresentou as mutações c.91C>A (p.Gln31Lys) e c.2795G>A (p.Arg932His), em heterozigose composta no gene *VWA3B*. Essa variante foi detectada no sequenciamento de todo o exoma. Mutações nesse gene foram relacionadas a deficiência intelectual associada à ataxia cerebelar de início na idade adulta, após os 40 anos[87].

Paciente com histórico de gestação sem intercorrências, mas com parto pós-termo. Logo após o nascimento paciente teve complicações respiratórias e necessitou permanência prolongada em UTI. Paciente evoluiu com hipotonia neonatal e atraso de marcos motores. Nos primeiros meses de vida pais notaram ptose palpebral bilateral. Na infância foi percebido déficit intelectual moderado. Os sintomas se mantiveram estáveis ao longo dos anos, e aos 24 anos, quando foi avaliado, foi observado a discreta ptose palpebral bilateral, com oftalmoparesia flutuante, sem fraqueza de musculatura esquelética, apesar de queixa de fatigabilidade. Não foi visto nenhum sinal de ataxia. Foram também observados hipertricose, palato ogival, implantação baixa das orelhas, alteração de arcada dentária e sobrancelha grossa (Figura 28). A eletroneuromiografia não demonstrou alterações. Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e

biópsia muscular não foi realizada. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com o que a paciente percebeu discreta melhora na fatigabilidade e sintomas oculares. Com tratamento, paciente manteve boa funcionalidade, sem qualquer restrição para realizar atividades físicas.

Família 49

Paciente 58, da família 49, é um paciente do sexo masculino de 12 anos de idade com origem étnica desconhecida, filho de pais não consanguíneos, que apresentou a mutação c.188A>G no gene *PTPN11* em homozigose. Essa variante foi detectada no sequenciamento de todo o exoma. Mutações em homozigose nesse gene estão relacionadas a síndrome de Noonan[88].

Paciente com histórico de gestação e parto sem intercorrências, apresentou quadro de ptose palpebral congênita, associada a hipotonia e dificuldade de sucção. Evoluiu com atraso dos marcos motores, e na infância foi percebido disfagia, disfonia e fadiga muscular em 4 membros. Ainda infância constatou-se grau leve de rebaixamento do nível de intelectual e autismo. Os sintomas se mantiveram estáveis ao longo dos anos, e aos 12 anos, quando foi avaliado, foi observado a discreta ptose palpebral bilateral, sem oftalmoparesia, fraqueza em membros inferiores apenas após fadiga induzida por exercício e escápula alada (Figura 28). Foram também observados leves dismorfismos, como palato alto, implantação baixa de orelhas, alteração de arcada dentária. Não havia fraqueza facial, de músculos mastigatórios ou apendiculares. A eletroneuromiografia não mostrou alterações. Eletromiografia de fibra única também foi realizada, e também não mostrou alterações no músculo orbicular do olho. Nível sérico de creatinofosfoquinase era normal, e biópsia muscular não

mostrou alterações. Foi iniciado tratamento com piridostigmina, com o que a paciente percebeu melhora da fadiga. Com tratamento, paciente manteve boa funcionalidade, com restrição apenas para correr.

Figura 28 - Ptose palpebral nos pacientes 25 (A), 52 (B) e 58 (C). D. Hipertricose em paciente 52. E. Escápula alada em paciente 58

Tabela 20 - Principais achados clínicos de pacientes não-SMC

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP	Gene provavelmente alterado
14/10	5/M	+	+	-/-/-	+	+	+	-	+	*SCN8A*
17/21	17/M	+	+	+/-/-	+	-	-	+	+	*DHCR7*
25/21	35/M	-	+	-/-/-	+	+	+	+	+	*LDB3*
52/43	24/M	+	+	-/-/-	+	-	-	-	+	*VWA3B*
58/49	12/M	+	+	-/-/-	+	-	+	-	+	*PTPN11*

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 21 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos de pacientes não-SMC

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/ AT2	CPKN	Gene provavelmente alterado
14/10	5/M	-	SD	SD	-	SD	+/+	+	*SCN8A*
17/21	17/M	-	SD	-	-	-	-/-	+	*DHCR7*
25/21	35/M	-	-	SD	-	-	+/+	+	*LDB3*
52/43	24/M	+	SD	SD	-	SD	SD	+	*VWA3B*
58/49	12/M	+	SD	SD	-	-	-/-	+	*PTPN11*

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

4.21 Aspectos Clínicos dos Pacientes não Diagnosticados

Dentre os 79 pacientes com SMC de 68 famílias incluídos no estudo, depois de todas as etapas para diagnóstico molecular, 16 pacientes de 16 diferentes famílias ainda permaneceram sem diagnóstico molecular definido ou provável. Considerando apenas os casos considerados sem diagnóstico, as principais características clínicas foram vistas com a seguinte frequência: início precoce dos sintomas - antes dos 2 anos - (50%), sintomas flutuantes (93,7%), comprometimento da musculatura ocular extrínseca (68,7%), ptose palpebral (93,7%), fraqueza dos membros (50%), fraqueza facial (31,2%) e sintomas bulbares (56,2%).

Evolução estável, com pouca restrição funcional, foi observado em 93,7% deles. Episódio de exacerbação intensa e aguda dos sintomas, apresentando-se como crise, foi relatado em 37,5%. Melhora dos sintomas com piridostigmina foi observada em 7 pacientes (62,5%). Em um paciente (6,25%) houve piora dos sintomas com piridostigmina. Apenas dois pacientes também receberam efedrina (50 mg duas vezes ao dia) e um deles apresentou boa resposta. Em três pacientes foi tentado também salbutamol, sendo que um obteve melhora e

os outros dois não tiveram resposta. Quanto às alterações neonatais, observou-se atraso motor em 31,2% dos pacientes, hipotonia neonatal em 25%, dificuldades de sucção em 12,5% e palato alto em 62,5%. Escoliose foi observada em 12,5% dos pacientes.

Dados de biópsia muscular estavam disponíveis em 10 dos 16 pacientes: 6 foram descritos com alterações leves e inespecíficas, 4 como normal, e apenas um com atrofia seletiva tipo II. O nível de creatinafosfoquinase foi normal nos 16 pacientes. Todos os pacientes tinham dados de eletroneuromiografia disponíveis: 31,2% apresentaram resposta decremental ao estímulo repetitivo de 3 Hz; em 25% deles, alterações miopáticas, associadas, ou não, ao decremento, foram observadas. Dos pacientes sem diagnóstico molecular, 10 foram submetidos ao estudo de fibra única, que demonstrou aumento de Jitter em 3, sendo que em dois deles não havia decremento ao estímulo repetitivo.

A Tabela 22 mostra sumariamente os principais dados clínicos dos pacientes sem diagnóstico molecular de SMC. A Tabela 23 mostra dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos.

Tabela 22 - Principais achados clínicos dos pacientes sem diagnóstico

Paciente/ Família	Idade (anos)/ Sexo	IP	FS	AMO/ APM/ PRI	PT	FA	SB	FF	CNP
10/6	15/M	+	-	+/+/+	+	+	-	+	+
11/7	8/M	+	+	-/-/-	+	+	+	-	+
15/11	21/M	+	+	+/+/+	+	-	-	-	+
34/29	23/F	+	+	+/+/+	+	-	-	+	+
35/30	22/F	-	+	+/+/+	+	-	-	-	+
44/36	51/M	-	+	+/+/+	+	-	-	-	+
45/37	9/F	+	+	-/-/-	+	+	-	-	+
53/44	13/F	-	+	-/-/-	+	-	+	+	+
54/45	26/M	+	+	-/-/-	+	-	+	-	+
55/46	30/F	-	+	+/-/-	+	+	+	+	+
56/47	60/F	-	+	+/-/-	+	+	-	-	+
57/48	44/F	+	+	+/+/+	+	+	+	-	+
69/59	3/F	+	+	+/+/+	+	-	+	-	+
71/61	13/M	+	+	-/-/-	+	+	-	-	+
73/63	17/F	+	+	-/-/-	+	-	-	-	+
74/64	22/F	-	+	-/-/-	-	+	+	+	+

+ = presente; - = ausente; IP = início precoce (antes dos 2 anos de idade); FS = flutuação dos sintomas; AMO = alteração de motricidade ocular; APM = alteração parcial da motricidade ocular; PRI= alteração da motricidade ocular poupando musculatura reto inferior; PT = ptose palpebral; FA = fraqueza apendicular; SB = sintomas bulbares; FF = fraqueza facial; CNP = curso não progressivo.

Tabela 23 - Dados de exames complementares e de resposta aos diferentes tratamentos dos pacientes sem diagnóstico

Paciente /Família	Idade (anos)/ Sexo	MP	ME	MS	RDER	JAFU	ABM/AT2	CPKN
10/6	15/M	-	SD	SD	+	-	+/-	+
11/7	8/M	+	SD	+	+	SD	SD	+
15/11	21/M	-	SD	-	-	SD	-/-	+
34/29	23/F	+	SD	SD	-	SD	SD	+
35/30	22/F	+	SD	SD	-	-	SD	+
44/36	51/M	-	-	-	-	+	SD	-
45/37	9/F	+	SD	SD	-	-	+/+	+
53/44	13/F	-	SD	SD	-	+	SD	+
54/45	26/M	+	SD	SD	-	-	+/-	+
55/46	30/F	+	SD	SD	+	+	-/-	+
56/47	60/F	+	SD	SD	SD	SD	-/-	+
57/48	44/F	+	SD	SD	-	-	+/+	+
69/59	3/F	+	SD	SD	+	SD	SD	+
71/61	13/M	+	SD	SD	-	-	-/-	+
73/63	17/F	-	SD	SD	-	-	-/-	+
74/64	22/F	-	SD	SD	+	SD	-/-	+

+ = presente; - = ausente; SD = sem dados, ou não testado; MP = melhora com piridostigmina; ME = melhora com efedrina; MS = melhora com salbutamol; RDER = resposta decremental ao estímulo repetitivo; JAFU= Jitter aumentado no estudo de fibra única; ABM = alteração na biópsia muscular; AT2 = atrofia seletiva tipo II; CPKN = nível sérico normal de CPK.

4.22 Comparação dos Dados Clínicos

Depois da análise molecular completa, 51 casos foram classificados como SMC confirmados (41 famílias); 7 como SMC provável (6 famílias); 5 como não-SMC (5 famílias) e 16 com não resolvidos (16 famílias). Uma listagem de todos os pacientes e seus diagnósticos moleculares pode ser encontrada na tabela do apêndice.

Algumas características clínicas foram particularmente frequentes em pacientes com SMC confirmada (Tabela 24): sintomas flutuantes (96%), ptose palpebral (92,1%), início precoce (90,1%), fraqueza nos membros (88,2%), palato alto (76,5%) e hipotonia neonatal (72,5%). Alteração de motricidade ocular extrínseca esteve presente em 82,3% (42 casos), 74,5% (38 casos) com comprometimento parcial. O olhar para baixo foi poupado em 70,5% (36 casos). Os pacientes *CHRNE* foram os que mais contribuíram para esses números, uma vez que 100% dos 30 casos confirmados apresentavam comprometimento da movimentação ocular, 90% parcial (n = 27), sendo 83,5% poupando o olhar para baixo (n = 24). Além disso, 100% dos *COLQ* confirmados (3 casos), 80% dos *RAPSN* confirmados (4 em 5 casos), 50% do *COL13A* (2 em 4) e os únicos casos de *SCN4A* e *CHAT* confirmados apresentaram comprometimento do movimento ocular, todos eles poupando o olhar para baixo.

No entanto, a alteração ocular isolada, ou síndrome ocular pura (apenas ptose palpebral e/ou alteração de motricidade ocular), foi pouco frequente na coorte, com apenas 8 casos. Na verdade, desses 8 casos, 5 foram classificados como casos não resolvidos, 2 como não-SMC e 1 como provável. Este caso provável apresentava 2 variantes intrônicas profundas em alelos diferentes do

gene *CHRND*. Mas nenhum paciente confirmado como SMC apresentava apenas sintomas oculares.

Outros achados clínicos frequentes nos casos confirmados foram: fraqueza facial (66,6%), sintomas bulbar (62,7%), atrasos nos marcos motores (60,7%) e fraqueza mastigatória (57,8%). Noventa e seis por cento dos casos confirmados não apresentavam alterações funcionais graves ou sintomas progressivos (classificados como de curso não progressivo). Todos os pacientes foram testados com piridostigmina, 23 também foram experimentados com salbutamol e 16 com efedrina. Boa resposta à piridostigmina, efedrina e salbutamol foi observada em 80,3%, 100% e 81,2% dos casos confirmados, respectivamente. Mais de 10% de decremento à estimulação repetitiva de 3 Hz foi observada em 85,7% dos 49 casos confirmados. Alterações miopáticas na eletromiografia foram observadas em 12 pacientes com diagnóstico molecular confirmado (24,4%). O estudo de fibra única revelou aumento do jitter em 95,2% deles. A Figura 29 mostra porcentagem de alterações eletrofisiológicas típicas de junção neuromuscular (decremento ao estímulo repetitivo ou aumento de jitter) nos 3 grupos de pacientes (SMC confirmados, sem diagnóstico e não-SMC). A biópsia muscular de 24 casos confirmados estava disponível e 91,6% estava alterada, sendo os achados mais frequentes: atrofia tipo II (37,5%) e predomínio do tipo I (24,4%). Em 10 de 12 casos de casos confirmados com alterações miopáticas (23,5%) na eletromiografia, a biópsia muscular estava disponível. Todas essas biópsias estavam alteradas, 3 (30%) com atrofia do tipo II e 3 com predomínio do tipo I.

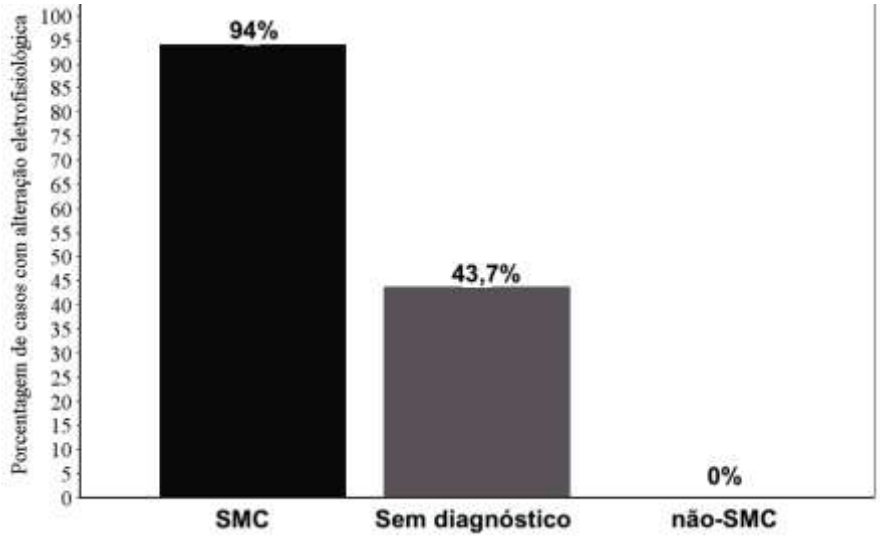

Figura 29 - Porcentagem de alterações eletrofisiológicas típicas de junção neuromuscular (decremento ao estímulo repetitivo ou aumento de jitter) nos 3 grupos de pacientes (SMC confirmados, sem diagnóstico e não-SMC)

Com o objetivo de se achar alguma alteração clínica que sugerisse uma maior probabilidade de se fechar o diagnóstico do ponto de vista molecular, dados dos pacientes sem diagnósticos e pacientes não-SMC foram comparados com os pacientes com diagnóstico confirmado de SMC (excluindo-se os prováveis). Assim, foram considerados para comparação 72 pacientes. O teste exato de Fisher de duas caudas foi usado para calcular os valores de *p* exatos de tabelas de contingência 2 × 2 (http://www.graphpad.com/ quickcalcs / contingency2.cfm).

A presença de história familiar de SMC e características clínicas na primeira infância, como hipotonia neonatal, dificuldades na amamentação e atrasos nos marcos motores foram significativamente mais frequentes nos casos confirmados de SMC ($p < 0,05$), considerando cada um separadamente. Este também foi o caso de presença de fraqueza apendicular, facial e mastigatória ($p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$).

A presença de síndrome ocular pura, com apenas alteração de motricidade ocular e/ou ptose palpebral, foi significantemente menor em pacientes confirmados de SMC (p < 0,0001).

Um período considerável com crises frequentes de miastenia (mais de uma vez por ano) também foi mais frequente nos casos confirmados (*p* <0,05), embora essa característica estivesse presente em apenas 33% deles. Em relação aos exames auxiliares, alguns resultados também foram mais frequentes nos casos confirmados: presença de decremento na estimulação repetitiva de 3 Hz (*p* < 0,0001), aumento do jitter na eletromiografia de fibra única (*p* < 0,0001) e alterações miopáticas na biópsia muscular (*p* < 0,01), especialmente atrofia do tipo 2 ou predominância do tipo 1 (*p* < 0,01). Na verdade, a atrofia tipo 2 foi associada a casos confirmados de *CHRNE* (*p* < 0,05), que foram a maioria dos casos confirmados. Por outro lado, entre os casos não-CMS, o comprometimento cognitivo foi significativamente mais frequente (*p* < 0,001) (Figura 30), e as alterações eletrofisiológicas menos frequentes (*p* < 0,01 para decremento e *p* < 0,05 por aumento de jitter).

O resumo de todas as comparações pode ser encontrado na Tabela 24

Tabela 24 - Comparação dos aspectos clínicos entre os grupos com e sem diagnóstico molecular de SMC

Característica	Porcentagem de casos confirmados (n = 51)	Porcentagem de casos sem diagnóstico (n = 16)	Porcentagem de casos não-SMC (n = 5)
Início Precoce / Flutuação dos sintomas / História familiar positiva	90* / 96 / 49*	50 / 94 /18	80 / 100 / 0
Ptose palpebral / Alteração de motricidade ocular extrínseca/parcial/poupando para baixo	92 / 82 / 74 / 70	94 / 69 / 56 /56	62 / 25 / 25 / 25
Síndrome ocular pura	0***	31	40
Fraqueza apendicular / Fraqueza axial	90** / 41	50 / 19	25 / 12
Sintomas bulbares / Escoliose	63 /23	56 / 12	37 / 20
Fraqueza para mastigação / Fraqueza facial	57***** / 67*	25 / 31	25 / 12
Sem limitação funcional importante / Acometimento respiratório importante/ alteração cognitiva	92 / 16 / 10	94 / 6 / 0	100 / 0 / 80*****
Crises: ao menos 1 episódio / mais que 1 por ano por vários anos	49 / 33*	37 / 12	0 / 0
Atraso motor / Hipotonia neonatal / Dificuldade de sucção	90*****/ 72*** /** 43*	50 / 25 / 12	80 / 100 / 20
Palato alto / Contraturas Congênitas	76 / 14	62 / 12	60 / 40
Resposta a piridostigmina: positiva / negativa / nenhuma	78 / 10 / 12	62 / 6 / 32	40 / 0 / 60
Resposta a β2-agonistas: efedrina (n=15) /salbutamol (n = 23)	100 (n=13)/ 81 (n=13)	50 (n = 1) / 33 (n = 1)	nt / 0
Alterações miopáticas na biópsia (n = 41): qualquer / atrofia tipo II/ predominância I	91*(n=22) / 37 (n=9) / 29*****(n= 7)	40 (n = 4) / 10 (n = 1) / 0	50 (n = 2) / 25 (n = 1) / 0
Resposta decremental ao estímulo repetitivo / alterações miopáticas na eletromiografia / aumento de jitter	86******* / 23 / 95******* (n = 21)	31 / 25 / 30 (n = 10)	0***** / 40 / 0***** (n = 3)

* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$, comparando cada categoria de um grupo contra dois outros grupos, excluindo os casos prováveis.

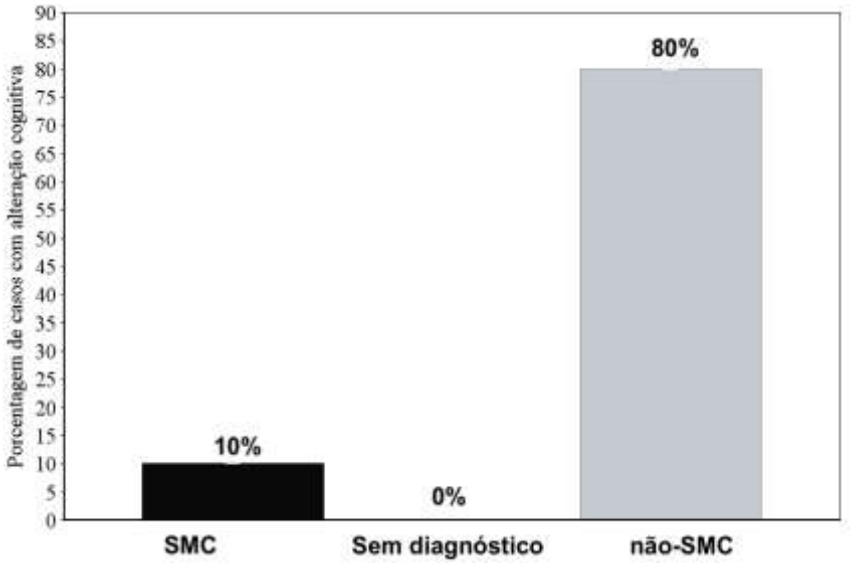

Figura 30 - Porcentagem de alterações cognitivas nos 3 grupos de pacientes (SMC confirmados, sem diagnóstico e não-SMC)

5 Discussão

As SMC compõe um grupo heterogêneo de doenças genéticas, sendo descrito atualmente mais de 30 genes como causadores das síndromes[33]. Em geral, mutações no gene *CHRNE*, costumam ser responsáveis pela maior parte dos casos, em torno de 50%[21].No entanto, a proporção dos demais genes varia consideravelmente de acordo com a região considerada[21,89-92]. Inclusive, em algumas regiões, outros genes aparecem como primeira causa de SMC, como em Israel por exemplo, onde mutações no gene *RAPSN* são as mais frequentes[91]. Dados referentes a genes causadores de SMC no Brasil são limitados a uma coorte de 25 pacientes de 18 diferentes famílias composta por uma população predominante de descendentes de Europeus provenientes do estado do Paraná, de Mihaylova e colaboradores[54]. De acordo com esse estudo, o gene que parece ser mais frequentemente relacionado à SMC no Brasil é o *CHRNE*, responsável por até 70% dos casos. A maioria dos pacientes apresenta a mutação c.130dupG, a qual também é comum em Portugal e Espanha[35]. O segundo gene mais encontrado foi o *DOK7*, e, ao contrário do que acontece na população europeia, variantes no gene *RAPSN* não foram encontradas nessa coorte[54].

No entanto, a população brasileira reflete uma mistura de europeus, ameríndios, africanos e asiáticos com diferenças regionais de contribuição genética[94], e por isso havia necessidade de se verificar se as peculiaridades moleculares dessa coorte citada se repetem quando se incluem pacientes de

outras regiões do país. No presente estudo, descrevemos uma coorte de 79 pacientes, de 68 diferentes famílias, com suspeita clínica de síndrome miastênica congênita, que foram submetidos a testes moleculares para confirmação diagnóstica. Após realização dos testes, 51 pacientes foram considerados confirmados, 7 como prováveis, 16 como sem diagnóstico e 5 pacientes foram diagnosticados como outra síndrome. Nenhum dos pacientes incluídos era proveniente do estado do Paraná, caracterizando uma população diferente daquela do estudo de Mihaylova[54]. Além disso, na atual análise molecular, consideramos para diagnóstico aproximadamente 15 genes a mais, que em 2010, quando o primeiro estudo foi publicado, ainda não haviam sido descritos como causadores de SMC.

Mesmo com essas diferenças verificamos uma porcentagem semelhante de cases atribuíveis a *CHRNE*, 53% dos casos índices confirmados. Já mutações em *DOK7,* responderam por 7,5% dos casos índices confirmados como SMC. Por outro lado, genes ainda não reportados na população daquele estudo foram identificados como causadores da SMC: 12,5% com mutações em *RAPSN*, 2,5% em *SCN4A*, 7,5% em *COL13A1* e 2,5% em *CHAT* e 1 em *GMPPB*. Ainda, encontramos 2 casos índices com mutação em *COLQ*, 2 em *GFPT1*, e 1 em *CHRNA1*, em uma frequência congruente com a do estudo anterior.

A frequência relativa de mutações nos diferentes genes em nossa coorte corresponde aproximadamente a outras frequências relatadas na literatura[94]. Algumas variantes comumente relatadas em coortes europeias foram recorrentes em nossa coorte (*CHRNE* c.130dupG, *RAPSN* p.N88K, *DOK7* c.1124_1127dupTGCC e *COLQ* c.219 + 1G> C), uma delas vista com alta frequência em pacientes brasileiros com SMC, c.130dupG, foi encontrada em

pelo menos um alelo em 21 casos índices (31%). Trata-se de uma variante conhecidamente patogênica, que leva a conversão do Glu-Pro-Glu do tipo selvagem nos códons 24-26 para os códons Gly-Ala-Ter no domínio extracelular, promovendo o truncamento do splicing. Foi descrita pela primeira vez em 1998, em dois pacientes turcos não relacionados[95]. No Brasil, um levantamento de 1000 exomas inteiros, encontrou essa variante na heterozigose em 9 indivíduos saudáveis, levando a uma prevalência estimada de 1 caso por 40.000 no Brasil (Kok F, observação pessoal). De fato, Mihaylova V. e colegas fizeram estudo do haplótipo relacionado a esta mutação, que sugeriu ser uma antiga mutação com efeito fundador, sendo o alelo do fundador compartilhado por pacientes da Espanha e Portugal[54]. No presente estudo, encontramos uma prevalência semelhante (com maior incidência de homozigose) entre os pacientes de outras regiões do país, principalmente no Estado de São Paulo, mas também em Minas Gerais e Nordeste. Dessa forma, essa mutação parece ser bastante prevalente em diferentes regiões do Brasil, provavelmente devido à ampla distribuição de ancestrais portugueses em todo o país. Em contraste, a outra mutação comum em *CHRNE* testada, c.1327delG, não foi vista em nenhum paciente da coorte. Esta variante está presente em até 50% dos indivíduos de etnia cigana europeia e / ou de origem do sudeste europeu com SMC[34,96], e não foi encontrada também na coorte do Paraná.

As características clínicas dos pacientes com a mutação c.130dupG são bastante similares àquelas com outras mutações CHRNE que levam à deficiência de AChR[34,97], embora algumas características clínicas pareçam estar fortemente ligadas a essa mutação específica. Os pacientes homozigotos apresentaram um comprometimento leve a moderado, com apenas pouca

restrição funcional em mais de 90% dos casos e menos de 10% apresentaram alta frequência de crise miastênica (mais que 1 episódio por ano). A resposta aos inibidores da acetilcolinesterase, alteração de motricidade ocular extrínseca, a ptose palpebral e a fraqueza dos membros também foram muito prevalentes entre eles. Por outro lado, as contraturas articulares congênitas estavam ausentes em todos os pacientes com a mutação. Isso deve-se provavelmente à boa função da junção neuromuscular fetal, que é mantida pela presença de AChR com subunidade gama no lugar do épsilon, evitando manifestações pré-natais graves. Em geral, a apresentação clínica dos pacientes homozigotos com *CHRNE* c.130dupG foi razoavelmente homogênea, ao contrário da grande variabilidade clínica mostrada em outras síndromes de SMC com outras mutações homozigotas[47,98]. Esses resultados corroboram achados do estudo do nosso grupo, derivado desta tese, com colaboração de outros centros do país[76]. Nesse referido estudo, 22 dos 29 pacientes c.130dupG desta presente tese foram incluídos, além de mais 10 de outros centros.

A mutação em *DOK7* c. 1124_1127dupTGCC, encontrada em cerca de 60% dos casos europeus de SMC relacionados a DOK7[62], foi encontrada em pelo menos um alelo de 3 casos índices (7,5%) do presente estudo, proporção um pouco menor que da coorte anterior (17%)[54]. Os 3 casos descritos aqui se apresentaram como o quadro típico de fraqueza de cinturas, sem acometimento de musculatura ocular extrínseca.

Curiosamente, houve importante presença da mutação em *RAPSN* comumente descrita em coortes europeias p.N88K[57,98], que foi encontrada em 5 casos índices (12,5%), e nunca havia sido reportada nessa população anteriormente, assim como nenhuma outra variante patogênica nesse gene.

Esse achado corrobora as hipóteses de que pacientes com *RAPSN* são subdiagnosticados em países da América do Sul e que a mutação p.N88K também deve ser testada em pacientes com SMC dessa origem. Quatro casos de *RAPSN* da nossa coorte apresentaram manifestação precoce dos sintomas, sendo dois deles com fenótipo com presença de crises graves respiratórias desde a infância. De forma surpreendente, um desses casos evoluiu com expressiva melhora dos sintomas, adquirindo funcionalidade normal na adolescência sem necessidade de tratamento sintomático, uma evolução não comumente relata. Na verdade, dos 73 casos de *RAPSN* relatados com dados de desfecho a longo prazo, todos exceto um (um caso de início precoce de SMC por *RAPSN* relatado por Burke e colegas[55]) apresentou algum nível de incapacidade após um longo período de acompanhamento[56,97-108]. Nesses casos, o tratamento sintomático é geralmente necessário para toda a vida, especialmente se crises de insuficiência respiratória estiverem presentes. Essa variabilidade de apresentação e evolução clínica foi ilustrada por estudo do nosso grupo, outro fruto desta tese, numa série de 3 casos, os quais foram incluídos neste presente estudo[80].

Casos de SMC relacionados a *CHAT* , *SCN4A* e *COL13A1* e *GMPPB* também ainda não haviam sido relatados na população brasileira. A paciente com mutações bi-alélicas no gene *CHAT* apresentou um fenótipo típico da doença[99], com frequentes apneias e episódios de insuficiência respiratória, além do fenômeno eletrofisiológico característico: decremento após estimulação repetitiva a alta frequência por tempo prolongado (utilizado no nosso caso, 2 minutos a 10Hz). Interessante notar que nesse caso a eletroneuromiografia inicial, feito com estímulo repetitivo a 3Hz, não demonstrou alterações, de forma

que somente por se suspeitar de SMC pré-sináptica que se realizou o protocolo específico. Esse fato demonstra a importância de se conhecer os principais fenótipos das SMC, visto que nesse caso permitiu tratamento específico antes mesmo que o diagnóstico molecular tivesse sido realizado.

Dos 2 casos de mutações no *SCN4A*, um foi considerado provável pelo fato de se tratar de mutação novas, ainda não descritas, em gene cujo fenótipo nas SMC ainda não é claramente caracterizado, com grande variabilidade fenotípica[110]. Variantes de ganho de função SCN4A dominantes são uma causa bem estabelecida de paralisia periódica hipercalêmica, paralisia periódica hipocalêmica, paramiotonia congênita e miotonia agravada por potássio e paralisia periódica. Há poucos anos, variantes patogênicas do SCN4A bi-alélicas foram descritas como estando relacionadas à miopatia congênita. O primeiro caso descrito na literatura de SMC relacionada a *SCN4A* é de uma mulher com retardo mental, ptose palpebral, limitação da motricidade ocular extrínseca e fraqueza muscular facial, de tronco e dos membros agravada pela atividade. A paciente apresentou crises súbitas de fraqueza respiratória e bulbar desde a infância e teve resposta parcial a piridostigmina[110]. O segundo caso descrito é uma mulher, sem retardo mental, com ptose palpebral, limitação da motricidade ocular extrínseca e fraqueza muscular em membros inferiores, que apresentava crises de fraqueza generalizada episódica de frequência de várias vezes por semana desde os 12 anos de idade. Não havia acometimento respiratório ou bulbar, e nem houve qualquer resposta a piridostigmina[112]. Um outro caso mais recentemente descrito é de uma mulher, sem retardo mental com quadro de fraqueza muscular de cinturas e flexão de pescoço e tronco, bem como uma ptose flutuante, fraqueza facial e oftalmoplegia, com episódios de fraqueza

generalizada, diárias, sem desencadeantes, acometendo por vezes musculatura bulbar e respiratória; nesse caso houve resposta parcial a piridostigmina[111]. O caso 16 do nosso estudo assemelha-se com os já descritos e essa paciente foi considerada confirmada. Já o caso 59 apresenta fenótipo muito diferente dos já descritos, com fenótipo de miopatia e SMC, com importante fraqueza proximal, com flutuação, embora sem alterações típicas de junção neuromuscular na eletroneuromiografia, a qual demonstrou apenas sinais de miopatia. Como há poucas descrições de SMC por *SCN4A*, poderia se especular que essa paciente apresenta fenótipo ainda não descrito, e sugerir uma expansão fenotípica de mutações bi-alélicas em tal gene. No entanto, para sustentar essa hipótese, seriam necessários estudos funcionais de tais variantes, comprovando defeitos sinápticos causados por elas. Por isso a classificamos como provável.

Também foi classificado como provável um caso de *CHRND,* com duas alterações intrônicas profundas preditas como patogênicas. Mutações no gene *CHRND* podem estar associadas a uma síndrome letal de múltiplos de pterígios, SMC de canal lento, SMC de canal rápido e SMC por deficiência de AChR[20]. A maioria dos casos descritos com mutação em *CHRND* apresentam Síndrome de canal lento e síndrome de canal rápido[113]. Estas síndromes claramente não se enquadrariam no caso clínico de nossa coorte. A síndrome de múltiplos pterígios é fatal antes do nascimento ou logo após o nascimento[114]. A maioria das síndromes de deficiência de receptor relacionadas a este gene também são muito graves[112,115-117], com apenas uma exceção, até onde pudemos encontrar na literatura, na qual o quadro descrito é leve, semelhante ao da nossa coorte[117]. A hipótese seria se tratar de uma síndrome por deficiência de receptor, mas o quadro clínico apresentado pelo paciente só foi descrito muito raramente

relacionado a este gene. Além disso, mutações intrônicas como as encontradas são difíceis de se garantir patogenicidade sem estudos funcionais. Por essas questões, consideramos o caso apenas como provável.

No final, mesmo após uso de sequenciamento de nova geração, em uma porção considerável dos casos não foi possível se chegar a um diagnóstico molecular sequer provável (20,2%). Além disso, 8,8% dos casos classificamos como prováveis pelo fato de apresentarem fenótipo compatível, mas com mutações em heterozigose (para síndrome recessivas) ou por apresentarem mutações bi-alélicas, no entanto com quadro não totalmente compatível (uma vez que não realizamos estudos funcionais). A incidência de casos não resolvidos é em parte explicada pelos critérios de inclusão muito abrangentes que foram usados. De fato, tanto sequenciamento completo de exoma, quanto o sequenciamento direto Sanger, possuem limitações para para o diagnóstico genético. Mutações de regiões regulatórias até agora desconhecidas, mutações intrônicas profundas, grandes deleções ou duplicações podem ter escapado de nossa estratégia de triagem. Além disso, provavelmente ainda existem genes causadores de SMC não identificados e isso talvez também contribua para a falta de diagnóstico confirmado[118].

Os casos não-CMS eram de alguma forma esperados, também pelos critérios de inclusão não serem restritos. Houve 5 casos não-SMC na coorte com outros diagnósticos que não as fenocópias típicas de SMC (miopatias congênitas e mitocondriais). A ausência dessas fenocópias típicas pode ser explicada pelo alto índice de biópsias musculares, o que provavelmente permitiu a identificação dessas miopatias. Por mais paradoxal que possa parecer, em nossas condições é muito mais fácil fazer uma biópsia muscular do que um teste genético,

especialmente testes de alto rendimento. De qualquer forma, a maioria deles apresentava algum sintoma incomum para SMC: ataxia, surdez, muitos dismorfismos, déficit cognitivo. O comprometimento cognitivo foi estatisticamente menos frequente entre os casos confirmados. Embora casos de SMC por *GMPPB*[66,119], *DPAGT1*[120,121] e *SNAP25*[122] frequentemente apresentam sintomas cognitivos associados, esta característica é conhecida por ser rara entre SMC em geral. Todos os casos não-SMC foram incluídos na coorte devido a sintomas de flutuação ocular, com ou sem fraqueza extra-ocular. Com critérios mais rígidos (incluindo apenas pacientes com decremento ou aumento de jitter confirmados, desconsiderando o padrão de fraqueza clínica), nenhum não-CMS seria incluído. Além disso, apenas três pacientes confirmados seriam perdidos (1 *CHRNE*, 1 *RAPSN*, 1 *DOK7*). Esses três casos não tiveram decremento na estimulação repetitiva de baixa frequência, mas o estudo de fibra única não foi possível de ser feito. Em outros 3 casos sem decremento em que foi realizado o estudo de jitter, havia e aumento de jitter significativo. No final, o decremento com estímulo repetitivo a 3Hz, e o aumento do jitter no estudo de fibra única foram estatisticamente mais frequentes nos casos confirmados. Talvez esse efeito se explique por haver, no grupo em que não se encontrou alterações genéticas compatíveis com o quadro clínico, um número considerável de casos que não são realmente SMC. Uma outra possível explicação seria que, possivelmente, casos de SMC com alterações eletrofisiológicas foram mais facilmente reconhecidas ao longo dos anos, de modo que genes ainda não atribuídos a SMC podem apresentar uma porcentagem menor desses achados.

As características clínicas usuais de SMC foram muito frequentes entre os casos confirmados, como início precoce dos sintomas, ptose palpebral,

alteração da motricidade ocular, fraqueza apendicular, sintomas bulbares, fraqueza facial e flutuação dos sintomas. Foram todos achados esperados, até porque algumas dessas características se enquadravam nos critérios de inclusão. O comprometimento do movimento ocular, com preservação relativa do olhar para baixo, foi um achado frequente entre os casos confirmados. Dentre os pacientes com oftalmoparesia, o olhar para baixo estava preservado, ou relativamente preservado, em associação ou não a outros músculos, em 70%, considerando os casos confirmados (n = 51). Esse fato pode indicar que os músculos retos inferiores tendem a ser os mais tardiamente afetados, uma vez que praticamente todos os músculos oculares tendem a ficar em última instância paréticos, especialmente em casos de mutação *CHRNE*[20](gene alterado em maior proporção na coorte). Esse dado pode ser importante para ajudar a diferenciar SMC de outras síndromes que no fenótipo há alteração de motricidade ocular extrínseca, como mitocondriopatias, miopatias congênitas ou mesmo miastenia gravis. No entanto, para se verificar essa hipótese, um estudo clínico comparativo entre estas síndromes seria necessário.

Por outro lado, nenhum caso de síndrome ocular pura (apenas ptose palpebral e/ou alteração de motricidade ocular) teve diagnóstico de SMC confirmado, e com presença estatisticamente menor em comparação com casos sem diagnóstico e casos não-SMC. Ainda, a presença de alteração ocular não teve significância estatística nos casos confirmados em comparação com os não-SMC e os sem diagnóstico, ao contrário de fraqueza apendicular, facial e da mastigação. A ausência de significância das alterações oculares, aliada à presença de significância em relação aos sintomas extraoculares, é possivelmente mais uma sugestão de que a síndrome ocular pura não é típica

da SMC, como já havia sido previamente sugerido[94]. Ou seja, as alterações oculares, apesar de serem muito comum, não são específicas para SMC. Quando se encontram isoladamente, sem fraqueza em outros músculos, as alterações oculares também não são sensíveis para SMC.

Por fim, com os achados da nossa coorte, é possível dizer também que os músculos estriados de forma geral são possivelmente afetados em casos de SMC. A biópsia muscular nos casos confirmados estava significativamente com mais alterações miopáticas, principalmente com atrofia tipo II e predominância I. Além disso, 23% dos casos confirmados apresentaram alterações miopáticas na eletromiografia.

6 Conclusões

1) O gene *CHRNE* é o principal gene envolvido em SMC em diferentes regiões do Brasil, sendo a mutação c.130dupG presente em aproximadamente 1/3 dos casos totais.

2) A mutação c.1327delG, comum em algumas regiões da Europa não foi encontrada em nenhum paciente, não parecendo exercer, portanto, papel relevante na SMC da população estudada.

3) Mutações no gene *RAPSN,* em especial a p.N88K, é de presença relevante em nossa população, podendo ser encontrada em até 10% dos casos.

4) Outros genes ainda não reportados na população brasileira também foram identificados como causadores da SMC: *CHAT, SCN4A*, e *COL13A1*.

5) A pesquisa das mutações comuns dos 3 genes mais frequentemente relacionados a SMC em nosso meio (c.130dupG no *CHRNE*, p.N88K no *RAPSN* e c.1124_1127dupTGCC no *DOK7*) pode levar a diagnóstico molecular em mais de 60% dos casos.

6) Mesmo com sequenciamento de todo exoma dos pacientes com SMC, não foi possível se encontrar o gene causador em uma considerável proporção da coorte (20,2%). Esse dado sugere que haja contribuição significativa de mutações intrônicas ou grandes deleções/duplicações na etiologia das SMC no Brasil, e que possa haver em nosso meio casos de SMC relacionados a genes ainda não descritos como causadores das síndromes.

7) Quadros clínicos com sintomas puramente oculares não são um fenótipo usual e não apresentam boa sensibilidade para confirmação molecular de SMC.

8) Alterações eletrofisiológicas exercem papel importante no diagnóstico, com grandes chances de prever diagnóstico molecular quando o quadro clínico é compatível.

9) Alterações miopáticas podem ser uma característica frequente da CMS, tanto evidenciada por biópsia quanto por eletromiografia.

10) Oftalmoparesia parcial, e não completa, com preservação total ou relativa do músculo reto inferior, parece ser um achado característico de SMC, independentemente do gene alterado.

7 Anexos

Anexo A – Parecer Consubstanciado Do Comitê De Ética E Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo clínico e molecular na miastenia congênita

Pesquisador: Edmar Zanoteli

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 42612515.2.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.016.086

Data da Relatoria: 25/03/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto é um estudo dos fatores genéticos da Miastenia Congênita a se realizar na Divisão de Clínica Neurológica do HC-FMUSP.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar as mutações genéticas eventualmente relacionadas às causas da miastenia

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, relacionando-se apenas à coleta de sangue. Os benefícios diretos relacionam-se apenas com o aconselhamento genético das famílias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa fará uso de técnicas bem estabelecidas e que não trazem riscos aos participantes. Não se esperam problemas na sua execução.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE é suficientemente claro e contempla adequadamente todos os direitos e prerrogativas dos participantes.

Recomendações:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.016.086

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto tem todas as condições para aprovação pela comissão.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 09 de Abril de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo B – Termo De Consetimento Livre E Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

_____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

_____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo clínico e molecular a Miastenia Congênita

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Edmar Zanoteli

CARGO/FUNÇÃO: Médico Pesquisador INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 68120

PESQUISADOR EXECUTANTE: Eduardo de Paula Estephan INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 146264

CARGO/FUNÇÃO: Doutorando

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Neurológica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

Neste documento explicamos o estudo que estamos realizando com os pacientes portadores de Miastenia Congênita (MC). Por favor, leia até o fim, para decidir se você aceita participar do estudo.

A Miastenia Congênita (MC) é uma doença congênita que ocasiona fraqueza muscular, que geralmente piora no final do dia, ou então com esforço físico. Os sintomas podem aparecer logo ao nascimento, no começo da infância, na adolescência ou no início da vida adulta. Os músculos dos olhos, braços e pernas são os mais comumente acometidos. Infelizmente a doença não tem cura, mas dependendo do tipo de Miastenia Congênita (MC), alguns remédios podem melhorar os sintomas de fraqueza. A sua causa são mutações (erros genéticos) herdadas do pai, da mãe, ou de ambos, que podem apresentar ou não os sintomas da doença. Em alguns casos, as mutações podem ocorrer durante a gestação do paciente, e nestes casos apenas o paciente é afetado.

Por se tratar de uma doença rara, a MC ainda não é completamente compreendida. Não se conhecem ainda todas as mutações que podem causar a doença, e nem mesmo todos os genes (locais dentro da célula que contêm as informações genéticas) onde as mutações podem ocorrer. Além disso, há uma grande variação na gravidade como a doença pode se apresentar, desde pacientes que nascem precisando de UTI por fraqueza dos músculos da respiração, até pacientes com uma fraqueza leve que não piora muito durante a vida e pode até mesmo surgir só na idade adulta e passar despercebida durante a infância.

Neste estudo, temos como objetivo tentar identificar, através de testes genéticos, as mutações que causaram a MC nos pacientes diagnosticados com esta doença, e saber se essas mutações foram herdadas dos pais ou são exclusivas dos pacientes.

Saber que mutações causam quais gravidades da doença permitirá no futuro melhorar o diagnóstico dos pacientes com MC como um todo, orientar os pais dos pacientes com

esta doença quanto ao prognóstico (chance de a doença de seus filhos ficar estável, melhorar ou piorar) e os tratamentos preventivos adequados. Além disso, permite saber se o tipo de MC do paciente pode melhorar dos sintomas com algum tipo de remédio.

No entanto, é importante informar que não há um benefício imediato em relação a cura para o paciente incluído no estudo. Há, sim, a possibilidade de saber se a mutação foi realmente herdada dos pais, o que pode ajudar a saber o risco de que novos filhos do casal possam ter a mesma doença. Além disso poderemos saber se há possibilidade de melhora dos sintomas e qual remédio poderíamos usar para isso. O tratamento e acompanhamento dos pacientes serão o mesmo, estando eles incluídos no estudo ou não.

Neste estudo, inicialmente, faremos uma consulta médica com o paciente e seus pais, não muito diferente das consultas regulares que habitualmente são feitas a cada seis meses no acompanhamento. Inclusive, aproveitaremos as datas já agendadas para as consultas. Perguntaremos detalhes sobre a história da doença do paciente, informações sobre sua gestação, parto e desenvolvimento durante os primeiros meses e anos de vida, exames e terapias realizadas, entre outros detalhes.

Em seguida, será feito o exame físico do paciente, em que realizaremos testes de mobilidade das articulações (juntas) e músculos, e solicitaremos ao paciente que realize algumas manobras um pouco desconfortáveis, como sentar-se no chão e levantar-se dele, caminhar na ponta dos pés, subir escadas e empurrar e puxar o braço do examinador com várias partes do corpo. Todas as solicitações, entretanto, sempre levarão em conta as capacidades máximas do paciente, e o mesmo poderá interromper o exame a qualquer momento caso se sinta cansado. O exame deve ser realizado com o paciente despido (mantendo vestimenta íntima), de forma que o médico possa observar o contorno e tamanho dos músculos durante os movimentos, além de possíveis deformidades esqueléticas, da coluna e articulações. Durante o exame, faremos também o registro fotográfico de várias partes do corpo e do rosto do paciente, com o objetivo de comparar as alterações do exame físico do paciente com as de outros pacientes portadores de MC. As fotografias serão usadas exclusivamente dentro do estudo, e preservarão o anonimato do paciente, para que o paciente não possa ser identificado por quem não estiver envolvido no estudo. Por exemplo, se usarmos fotos do rosto do paciente em algum relatório ou registro em computador, aplicaremos faixas pretas para evitar a identificação completa do rosto. Em nenhum momento poremos nomes diretamente nas fotos. Caso precisem ser identificadas, serão usados códigos com letras e números. Do mesmo modo que para as fotografias, as informações e dados

relacionados aos pacientes, bem como materiais coletados, serão usados apenas dentro desta pesquisa, em sigilo.

Ao final do exame físico, o paciente e seus pais serão encaminhados para a coleta de sangue periférico de uma veia do antebraço. A amostra de sangue de cada um, no total de 5 a 10 ml (uma seringa pequena), será armazenada nos laboratórios do Hospital das Clínicas e usada posteriormente para os testes genéticos. A coleta não é diferente dos "exames de sangue" feitos normalmente nos laboratórios de hospitais e clínicas. Normalmente, a coleta é realizada apenas uma vez, porque a quantidade de sangue coletada é suficiente para uma grande quantidade de testes genéticos. Em algumas raras situações, poderemos vir a solicitar uma nova coleta de sangue caso testes adicionais sejam necessários.

Os resultados dos testes genéticos, tão logo sejam completados, serão informados aos responsáveis pelo paciente, caso seja de seu interesse, com o objetivo de aconselhamento genético (informação do risco de que novos filhos possam apresentar a doença).

É importante salientar que **não será necessária a repetição da eletroneuromiografia**, que necessariamente já foi realizada para que o paciente tenha tido o diagnóstico de MC.

Em qualquer momento do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador principal é o dr. Edmar Zanoteli, e o pesquisador executante é o dr. Eduardo de Paula Estephan. Ambos podem ser encontrados no ambulatório de doenças neuromusculares do HC-FMUSP, que fica no prédio dos ambulatórios, 6º andar, todas as terças-feiras, pela manhã (mesmo lugar e horários das consultas regulares dos pacientes). Em outros horários durante a semana, ambos podem ser contactados por telefone na FMUSP, LIM45, telefone (11) 3061-7460. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 5º andar, tel. (11) 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20, fax (11) 3069-6442, ramal 26, email: cappesq@hcnet.usp.br.

Também em qualquer momento, você poderá desistir de participar do estudo, ficando claro que esta desistência não impedirá o paciente de continuar o acompanhamento médico no ambulatório de doenças neuromusculares do HC-FMUSP.

Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Por outro lado, também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional para realizar os testes genéticos, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

_____

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

_____

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

Anexo C - Publicação relacionada com a tese

Autores: Estephan EP, Sobreira CFDR, Dos Santos ACJ, Tomaselli PJ, Marques W Jr, Ortega RPM, Costa MCM, da Silva AMS, Mendonça RH, Caldas VM, Zambon AA, Abath Neto O, Marchiori PE, Heise CO, Reed UC, Azuma Y, Töpf A, Lochmüller H, Zanoteli E.

Periódico: Journal of Neurology. 2018 Mar;265(3):708-713.

Título: A common CHRNE mutation in Brazilian patients with congenital myasthenic syndrome

Resumo: The most common causes of congenital myasthenic syndromes (CMS) are CHRNE mutations, and some pathogenic allelic variants in this gene are especially frequent in certain ethnic groups. In the southern region of Brazil, a study found the c.130dupG CHRNE mutation in up to 33% of families with CMS. Here, we aimed to verify the frequency of this mutation among individuals with CMS in a larger cohort of CMS patients from different areas of Brazil and to characterize clinical features of these patients. Eighty-four patients with CMS, from 72 families, were clinically evaluated and submitted to direct sequencing of the exon 2 of CHRNE. The c.130dupG mutation was found in 32 patients (23 families), with 26 patients (19 families, 26.3%) in homozygosis, confirming its high prevalence in different regions of Brazil. Among the homozygous patients, the following characteristics were frequent: onset of symptoms before 2 years of age (92.3%), little functional restriction (92.3%), fluctuating symptoms (100%), ocular muscle impairment (96.1%), ptosis (100%), limb weakness (88.4%), response to pyridostigmine (100%), facial involvement (77%), and bulbar symptoms (70.8%). The pretest probability of finding at least one allele harbouring the c.130dupG mutation was 38.1%. Selecting only patients with impaired eye movement together with limb weakness and improvement with pyridostigmine, the probability increases to 72.2%. This clinical pre-selection of patients is likely a useful tool for regions where CHRNE mutations have a founder effect. In conclusion, the CHRNE mutation c.130dupG leads to fairly benign natural course of the disease with relative homogeneity.

Anexo D - Publicação relacionada com a tese

Autores: Estephan EP, Zambon AA, Marchiori PE, da Silva AMS, Caldas VM, Moreno CAM, Reed UC, Horvath R, Töpf A, Lochmüller H, Zanoteli E.

Periódico: Neuromuscular Disorders. 2018 Nov;28(11):961-964.

Título: Clinical variability of early-onset congenital myasthenic syndrome due to biallelic RAPSN mutations in Brazil.

Resumo: Mutations in RAPSN are an important cause of congenital myasthenic syndrome (CMS), leading to endplate acetylcholine receptor deficiency. We present three RAPSN early-onset CMS patients (from a Brazilian cohort of 61 CMS patients). Patient 1 and patient 2 harbor the mutation p.N88K in homozygosity, while patient 3 harbors p.N88K in compound heterozygosity with another pathogenic variant (p.V165M; c.493G ≥ A). At onset, patient 3 presented with more severe symptoms compared to the other two, showing generalized weakness and repeated episodes of respiratory failure in the first years of life. During adolescence, she became gradually less symptomatic and does not require medication anymore, presenting better long-term outcomes than patients 1 and 2. This case series illustrates the variability of RAPSN early-onset CMS, with patient 3, despite severe onset, revealing an almost complete reversal of myasthenic symptoms, not limited to apneic episodes. Moreover, it suggests that RAPSN CMS may be underdiagnosed in non-European countries.

Anexo E - Publicação relacionada com a tese

Autores: Rodríguez Cruz PM, Cossins J, Estephan EP, Munell F, Selby K, Hirano M, Maroofin R, Mehrjardi MYV, Chow G, Carr A, Manzur A, Robb S, Munot P, Wei Liu W, Banka S, Fraser H, De Goede C, Zanoteli E, Conti Reed U, Sage A, Gratacos M, Macaya A, Dusl M, Senderek J, Töpf A, Hofer M, Knight R, Ramdas S, Jayawant S, Lochmüller H, Palace J, Beeson D.

Periódico: Brain. 2019 Jun 1;142(6):1547-1560.

Título: The clinical spectrum of the congenital myasthenic syndrome resulting from COL13A1 mutations.

Resumo: Next generation sequencing techniques were recently used to show mutations in COL13A1 cause synaptic basal lamina-associated congenital myasthenic syndrome type 19. Animal studies showed COL13A1, a synaptic extracellular-matrix protein, is involved in the formation and maintenance of the neuromuscular synapse that appears independent of the Agrin-LRP4-MuSK-DOK7 acetylcholine receptor clustering pathway. Here, we report the phenotypic spectrum of 16 patients from 11 kinships harbouring homozygous or heteroallelic mutations in COL13A1. Clinical presentation was mostly at birth with hypotonia and breathing and feeding difficulties often requiring ventilation and artificial feeding. Respiratory crisis related to recurrent apnoeas, sometimes triggered by chest infections, were common early in life but resolved over time. The predominant pattern of muscle weakness included bilateral ptosis (non-fatigable in adulthood), myopathic facies and marked axial weakness, especially of neck flexion, while limb muscles were less involved. Other features included facial dysmorphism, skeletal abnormalities and mild learning difficulties. All patients tested had results consistent with abnormal neuromuscular transmission. Muscle biopsies were within normal limits or showed non-specific changes. Muscle MRI and serum creatine kinase levels were normal. In keeping with COL13A1 mutations affecting both synaptic structure and presynaptic function, treatment with 3,4-diaminopyridine and salbutamol resulted in motor and respiratory function improvement. In non-treated cases, disease severity and muscle strength improved gradually over time and several adults recovered normal muscle strength in the limbs. In summary, patients with COL13A1 mutations present mostly with severe early-onset myasthenic syndrome with feeding and

breathing difficulties. Axial weakness is greater than limb weakness. Disease course improves gradually over time, which could be consistent with the less prominent role of COL13A1 once the neuromuscular junction is mature. This report emphasizes the role of collagens at the human muscle endplate and should facilitate the recognition of this disorder, which can benefit from pharmacological treatment.

Anexo F- Publicação relacionada com a tese

Autores: Abath Neto O, Heise CO, Moreno CA, Estephan EP, Mesrob L, Lechner D, Boland A, Deleuze JF, Oliveira AS, Reed UC, Biancalana V, Laporte J, Zanoteli E.

Periódico: The Canadian journal of neurological sciences. 2017 Jan;44(1):125-127.

Título: Nonlethal CHRNA1-Related Congenital Myasthenic Syndrome with a Homozygous Null Mutation.

Resumo não disponível

8 Referências

1- Wood SJ, Slater CR. Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog Neurobiol* 2001;64(04):393–429

2- Handbook of Clinical Neurology, Vol. 91 (3rd series) Neuromuscular junction disorders 2008 A.G. Engel, Editor. Chapter 3. 103-48

3- Matthews-Bellinger J, Salpeter MM. Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. *J Physiol* 1978; 279: 197–213.

4- Rizzoli S, Betz WJ. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 57–69.

5- Rettig J, Sheng Z-H, Kim DK, Hodson CD, Snutch TP, Catterall WA. Isoform-specific interaction of the a1A subunits of brain Ca2þ channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7363–7368.

6- Charvin N, Leveque C, Walker D, Berton F, Raymond C, Kataoka M, Shoji-Kasai Y, Takahashi M, De Waard M, Seagar MJ. Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the a1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *EMBO J* 1997; 16: 4591–4596.

7- Leveque C, Pupier S, Marqueze B, Geslin L, Kataoka M, Takahashi M, De Waard M, Seagar M. Interaction of cysteine string proteins with the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *J Biol Chem*. 1998; 273(22):13488-92.

8- Ryan TA. Inhibitors of myosin light-chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing. *J Neurosci* 2001; 19: 1317–1323.

9- Becherer U, Guatimosism C, Betz WJ. Effects of staurosporine on exocytosis and endocytosis at frog motor nerve terminals. *J Neurosci* 2001; 217: 782–787.

10- Gerald K (2002). Cell and Molecular Biology (4th ed.). John Wiley & Sons.

11- Van der Kloot W, Molgó J. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev*. 1994 Oct;74(4):899-991. doi: 10.1152/physrev.1994.74.4.899. PMID: 7938228.

12- Massoulie´ J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog Neurobiol 1993; 41: 31–91.

13- Hall ZW. Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *J Neurobiol*. 1973;4(4):343-61.

14- Arredondo J, Lara M, Ng F, Gochez DA, Lee DC, Logia SP, Nguyen J, Maselli RA. COOH-terminal collagen Q (COLQ) mutants causing human deficiency of endplate acetyl-cholinesterase impair the interaction of ColQ with proteins of the basal lamina. *Hum Genet* 2014;133(05):599–616

15- Bon S, Coussen F, Massoulié J. Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J Biol Chem*. 1997 Jan 31; 272(5):3016-21.

16- Flucher BE, Daniels MP. Distribution of Naþ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron* 1989; 3: 163–175.

17- Meier T, Wallace BG. Formation of the neuromuscular junction. *BioEssays* 1998; 20: 819–829.

18- Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA. LDL-receptor- related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 2006;133(24):4993–5000

19- Sandow A (1952). "Excitation-Contraction Coupling in Muscular Response". *Yale J Biol Med*. 25 (3): 176–201.

20- Engel AG, Shen X-M, Selcen D, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol* 2015;14(04):420–434

21- Abicht A, Müller J S, Lochmüller H. Congenital Myasthenic Syndromes. 2003 May 9 [Updated 2016 Jul 14]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1168 (acessed 10/02/2018)

22- Müller JS, Mihaylova V, Abicht A, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndromes: spotlight on genetic defects of neuromuscular transmission. *Expert Rev Mol Med*. 2007 Aug 9;9(22):1-20.

23- Dumitru D, Amato AA, Zwarts MJ. Neuromuscular junction disorders. Electrodiagnostic medicine. Second Edition. Philadelphia: Hanley and Belfus Inc; 2002. pp. 1127-227.

24- Whittaker RG. Testing the neuromuscular junction: what neurophysiology can offer the neurologist. *Pract Neurol* 2011; 11(05):303–307

25- AAEM Quality Assurance Committee American Association of Electrodiagnostic Medicine. Literature review of the usefulness of repetitive nerve stimulation and single fiber EMG in the electrodiagnostic evaluation

of patients with suspected myasthenia gravis or Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve*. 2001a;24(9):1239-47.

26- Byring RF, Pihko H, Tsujino A, et al. Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscul Disord* 2002;12(06):548–553.

27- Ekstedt J. Human single fiber action potentials. Extracellular recording during voluntary and chemical activation. With some comments on end-plate physiology and on the fiber arrangement of the motor unit. *Acta Physiol Scand* Suppl. 1964;SUPPL226:1+.

28- Stålberg E. Propagation velocity in human muscle fibers in situ. *Acta Physiol Scand* Suppl. 1966;287:1–112.

29- Ekstedt J, Stalberg E. Myasthenia gravis. Diagnostic aspects by a new electrophysiological method. *Opuscular Medica*. 1967;(12):73-6.

30- Ekstedt J, Stålberg E. The effect of non-paralytic doses of D-tubocurarine on individual motor end-plates in man, studied with a new electrophysiological method. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1969;27(6):557-62.

31- Stålberg E, Ekstedt J, Broman A. The electromyographic jitter in normal human muscles. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1971;31(5):429-38.

32- Kouyoumdjian JA, Stålberg E. Reference jitter values for concentric needle electrodes in voluntarily activated extensor digitorum communis and orbicularis oculi muscles. *Muscle Nerve*. 2008;37(6):694-9.

33- McMacken G, Abicht A, Evangelista T, Spendiff S, Lochmüller H. The Increasing Genetic and Phenotypical Diversity of Congenital Myasthenic Syndromes. *Neuropediatrics*. 2017 Aug;48(4):294-308.

34- Abicht A, Stucka R, Karcagi V, Herczegfalvi A, Horvath R, Mortier W, Schara U, Ramaekers V, Jost W, Brunner J, Janssen G, Seidel U, Schlotter B, Müller-Felber W, Pongratz D, Rudel R, Lochmuller H. A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology*. 1999;53:1564–9.

35- Beeson D, Hantai D, Lochmuller H, Engel AG. 126th International Workshop: congenital myasthenic syndromes, 24-26 September 2004, Naarden, the Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2005;15:498–512

36- Nicolau S, Milone M. The electrophysiology of presynaptic congenital myasthenic syndromes with and without facilitation: from electrodiagnostic findings to molecular mechanisms. *Front Neurol* 2019; 10:257.

37- Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, Udd B, Beyring R, Robb S, Kirkham FJ, Engel AG. Choline acetyltransferase mutations cause

myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2017–2022.

38- Arican P, Gencpinar P, Cavusoglu D, Olgac Dundar N. Clinical and Genetic Features of Congenital Myasthenic Syndromes due to CHAT Mutations: Case Report and Literature Review. *Neuropediatrics*. 2018; 21 (publicação online, antes da impressa).

39- Schara U, Christen HJ, Durmus H, et al. Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic syndrome due to CHAT mutations. *Eur J Paediatr Neurol* 2010;14(04):326–333.

40- Tan JS, Ambang T, Ahmad-Annuar A, Rajahram GS, Wong KT, Goh KJ. Congenital myasthenic syndrome due to novel CHAT mutations in an ethnic kadazandusun family. *Muscle Nerve*. 2016;53(5):822-6.

41- Vanhaesebroucka AE, Beenson D. The congenital myasthenic syndromes: expanding genetic and phenotypic spectrums and refining treatment strategies. *Co-Neurology*. 2019

42- Maselli RA, Ng JJ, Anderson JA, et al. Mutations in LAMB2 causing a severe form of synaptic congenital myasthenic syndrome. *J Med Genet* 2009; 46:203 – 208.

43- Maselli RA, Arredondo J, Vazquez J, et al. A presynaptic congenital myasthenic syndrome attributed to a homozygous sequence variant in LAMA5. *Ann N Y Acad Sci* 2018; 1413:119–125.

44- Haronen H, Zainul Z, Tu H, et al. Collagen XIII secures pre and postsynaptic integrity of the neuromuscular synapse. *Hum Mol Genet* 2017; 26:2076–2090.

45- Rodrıguez Cruz PM, Cossins J, Estephan EP, et al. The clinical spectrum of the congenital myasthenic syndrome resulting from COL13A1 mutations. *Brain* 2019; 142:1547–1560.

46- Evangelista T, Hanna M, Lochmüller H. Congenital Myasthenic Syndromes with Predominant Limb Girdle Weakness. *J Neuromuscul Dis*. 2015 Jul 22;2(Suppl 2):S21-S29.

47- Mihaylova V, Müller JS, Vilchez JJ, et al. Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain* 2008;131(Pt 3):747–759.

48- Shapira YA, Sadeh ME, Bergtraum MP, et al. Three novel COLQ mutations and variation of phenotypic expressivity due to G240X. *Neurology* 2002;58(04):603–609

49- Ohno K, Brengman J, Tsujino A, Engel AG. Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail

subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95(16):9654–9659

50- Burden SJ, Yumoto N, Zhang W. The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5:a009167

51- Owen D, Topf A, Preethish-Kumar V, et al. Recessive variants of MuSK are & associated with late onset CMS and predominant limb girdle weakness. *Am J Med Genet A* 2018; 176:1594–1601.

52- Murali C, Li D, Grand K, et al. Isolated vocal cord paralysis in two siblings with compound heterozygous variants in MUSK: expanding the phenotypic spec- trum. *Am J Med Genet A* 2019; 179:655 – 658.

53- Wadwekar V, Pillai RR, Sesh S, et al. Pregnancy-associated respiratory failure in muscle specific kinase congenital myasthenic syndrome. *Muscle Nerve* 2019; 59:E24 – E26.

54- Mihaylova V, Scola RH, Gervini B, Lorenzoni PJ, Kay CK, Werneck LC, Stucka R, Guergueltcheva V, von der Hagen M, Huebner A, Abicht A, Müller JS, Lochmüller H. Molecular characterisation of congenital myasthenic syndromes in Southern Brazil. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Sep;81(9):973-7.

55- Burke G, Cossins J, Maxwell S, Owens G, Vincent A, Robb S, Nicolle M, Hilton-Jones D, Newsom-Davis J, Palace J, Beeson D. Rapsyn mutations in hereditary myasthenia: distinct early- and late-onset phenotypes. *Neurology* 2003; 61:826–8.

56- Natera-de Benito D, Bestué M, Vilchez JJ, Evangelista T, Töpf A, García-Ribes A, Trujillo-Tiebas MJ, García-Hoyos M, Ortez C, Camacho A, Jiménez E, Dusl M, Abicht A, Lochmüller H, Colomer J, Nascimento A. Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic syndrome due to RAPSN mutations. *Neuromuscul Disord* 2016; 26(2): 153–9.

57- Richard P, Gaudon K, Andreux F, Yasaki E, Prioleau C, Bauché S, Barois A, Ioos C, Mayer M, Routon MC, Mokhtari M, Leroy JP, Fournier E, Hainque B, Koenig J, Fardeau M, Eymard B, Hantaï D. Possible founder effect of rapsyn N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes. *J Med Genet* 2003; 40(6):e81.

58- Müller JS, Abicht A, Burke G, Cossins J, Richard P, Baumeister SK, Stucka R, Eymard B, Hantaï D, Beeson D, Lochmüller H. The congenital myasthenic syndrome mutation RAPSN N88K derives from an ancient Indo-European founder. *J Med Genet* 2004; 41(8):e104.

59- Yamanashi Y, Higuch O, Beeson D. Dok-7/MuSK signaling and a congenital myasthenic syndrome. *Acta Myol* 2008;27:25–29

60- Palace J. DOK7 congenital myasthenic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1275:49-53.

61- Tsao CY. Effective Treatment With Albuterol in DOK7 Congenital Myasthenic Syndrome in Children. *Pediatr Neurol*. 2016; 54:85-7.

62- Cossins J, Liu WW, Belaya K, et al. The spectrum of mutations that underlie the neuromuscular junction synaptopathy in DOK7 congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2012;21(17): 3765–3775

63- Senderek J, Muller JS, Dusl M, et al. Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect. *Am J Hum Genet* 2011; 88:162 – 172.

64- Belaya K, Finlayson S, Slater CR, et al. Mutations in DPAGT1 cause a limb-girdle congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates. *Am J Hum Genet* 2012; 91:193 – 201.

65- Cossins J, Belaya K, Hicks D, et al. Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain* 2013; 136:944 – 956.

66- Belaya K, Rodriguez Cruz PM, Liu WW, et al. Mutations in GMPPB cause congenital myasthenic syndrome and bridge myasthenic disorders with dystroglycanopathies. *Brain* 2015; 138:2493 – 2504.

67- Feresiadou A, Casar-Borota O, Dragomir A, Oldfors CH, Stålberg E, Oldfors A. Tubular aggregates in congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord*. 2018 Feb;28(2):174-175.

68- Guergueltcheva V, Müller JS, Dusl M, Senderek J, Oldfors A, Lindbergh C, Maxwell S, Colomer J, Mallebrera CJ, Nascimento A, Vilchez JJ, Muelas N, Kirschner J, Nafissi S, Kariminejad A, Nilipour Y, Bozorgmehr B, Najmabadi H, Rodolico C, Sieb JP, Schlotter B, Schoser B, Herrmann R, Voit T, Steinlein OK, Najafi A, Urtizberea A, Soler DM, Muntoni F, Hanna MG, Chaouch A, Straub V, Bushby K, Palace J, Beeson D, Abicht A, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates caused by GFPT1 mutations. *J Neurol* 2012;259(05):838–850

69- Sine SM. End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease. *Physiol Rev* 2012;92(03): 1189–1234

70- Webster R, Liu W-W, Chaouch A, Lochmüller H, Beeson D. Fast-channel congenital myasthenic syndrome with a novel acetylcholine receptor mutation at the α-ε subunit interface. *Neuromuscul Disord* 2014;24(02):143–147

71- Schara U, Lochmüller H. Therapeutic strategies in congenital myasthenic syndromes. Neurotherapeutics 2008;5(04):542–547.

72- Chaouch A, Müller JS, Guergueltcheva V, et al. A retrospective clinical study of the treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome. *J Neurol* 2012;259(03):474–481

73- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988; 16: 1215.

74- Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Vincent MC, et al. Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. ENMC International Consortium on Myotubular Myopathy. European Neuro-Muscular Center. *Human molecular genetics*. 1997; 6: 1505-11.

75- den Dunnen JT and Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human mutation*. 2000; 15: 7-12.

76- Estephan EP, Sobreira CFDR, Dos Santos ACJ, Tomaselli PJ, Marques W Jr, Ortega RPM, Costa MCM, da Silva AMS, Mendonça RH, Caldas VM, Zambon AA, Abath Neto O, Marchiori PE, Heise CO, Reed UC, Azuma Y, Töpf A, Lochmüller H, Zanoteli E. A common CHRNE mutation in Brazilian patients with congenital myasthenic syndrome. *J Neurol*. 2018 Mar;265(3):708-713.

77- Barisic N, Schmidt C, Sidorova OP, et al. Congenital myasthenic syndrome (CMS) in three European kinships due to a novel splice mutation (IVS7-2A/G) in the epsilon acetylcholine receptor (AChR) subunit gene. *Neuropediatrics* 2002; 33: 249–254.

78- Imperatore V, Mencarelli MA, Fallerini C, Bianciardi L, Ariani F, Furini S, Renieri A, Mari F, Frullanti E. Potentially treatable disorder diagnosed post Mortem by exome analysis in a boy with respiratory distress. *Int J Mol Sci* 2016; 17(3):306.

79- Müller JS, Baumeister SK, Rasic VM, Krause S, Todorovic S, Kugler K, Müller-Felber W, Abicht A, Lochmüller H. Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations. *Neurology*. 2006 Oct 10;67(7):1159-64. doi: 10.1212/01.wnl.0000233837.79459.40.

80- Estephan EP, Zambon AA, Marchiori PE, da Silva AMS, Caldas VM, Moreno CAM, Reed UC, Horvath R, Töpf A, Lochmüller H, Zanoteli E. Clinical variability of early-onset congenital myasthenic syndrome due to biallelic RAPSN mutations in Brazil. *Neuromuscul Disord*. 2018 Nov;28(11):961-964.

81- Müller JS, Herczegfalvi A, Vilchez JJ, Colomer J, Bachinski LL, Mihaylova V, Santos M, Schara U, Deschauer M, Shevell M, Poulin C, Dias A, Soudo A, Hietala M, Aärimaa T, Krahe R, Karcagi V, Huebner A, Beeson D, Abicht A, Lochmüller H. Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes. *Brain*. 2007;130:1497-506.

82- Abath Neto O, Heise CO, Moreno CA, Estephan EP, Mesrob L, Lechner D, Boland A, Deleuze JF, Oliveira AS, Reed UC, Biancalana V, Laporte J, Zanoteli E. Nonlethal CHRNA1-Related Congenital Myasthenic Syndrome with a Homozygous Null Mutation. *Can J Neurol Sci*. 2017 Jan;44(1):125-127. doi: 10.1017/cjn.2016.322.

83- Anand G, Collett-White F, Orsini A, Thomas S, Jayapal S, Trump N, Zaiwalla Z2, Jayawant S. Autosomal dominant SCN8A mutation with an unusually mild phenotype. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016;20(5):761-5.

84- Trudeau MM, Dalton JC, Day JW, Ranum LP, Meisler MH. Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel SCN8A in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation. *J Med Genet*. 2006;43(6):527-30.

85- Atchaneeyasakul LO, Linck LM, Connor WE, Weleber RG, Steiner RD. Eye findings in 8 children and a spontaneously aborted fetus with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*. 1998 Dec 28;80(5):501-5.

86- Selcen, D., Engel, A. G. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann. Neurol*. 57: 269-276, 2005.

87- Kawarai, T., Tajima, A., Kuroda, Y., Saji, N., Orlacchio, A., Terasawa, H., Shimizu, H., Kita, Y., Izumi, Y., Mitsui, T., Imoto, I., Kaji, R. A homozygous mutation of VWA3B causes cerebellar ataxia with intellectual disability. J. Neurol. *Neurosurg. Psychiat*. 87: 656-662, 2016.

88- Musante, L., Kehl, H. G., Majewski, F., Meinecke, P., Schweiger, S., Gillessen-Kaesbach, G., Wieczorek, D., Hinkel, G. K., Tinschert, S., Hoeltzenbein, M., Ropers, H.-H., Kalscheuer, V. M. Spectrum of mutations in PTPN11 and genotype-phenotype correlation in 96 patients with Noonan syndrome and five patients with cardio-facio-cutaneous syndrome. *Europ. J. Hum. Genet*. 11: 201-206, 2003. Note: Erratum: Europ. *J. Hum. Genet*. 11: 551 only, 2003.

89- Durmus H, Shen XM, Serdaroglu-Oflazer P, Kara B, Parman-Gulsen Y, Ozdemir C, Brengman J, Deymeer F, Engel AG. Congenital myasthenic syndromes in Turkey: Clinical clues and prognosis with long term follow-up. *Neuromuscul Disord*. 2018; 28(4):315-322.

90- Natera-de Benito D, Töpf A, Vilchez JJ, González-Quereda L, Domínguez-Carral J, Díaz-Manera J, Ortez C, Bestué M, Gallano P, Dusl M, Abicht A, Müller JS, Senderek J, García-Ribes A, Muelas N, Evangelista T, Azuma Y, McMacken G, Paipa Merchan A, Rodríguez Cruz PM, Camacho A, Jiménez E, Miranda-Herrero MC, Santana-Artiles A, García-Campos O, Dominguez-Rubio R, Olivé M, Colomer J, Beeson D, Lochmüller H, Nascimento A. Molecular characterization of congenital myasthenic syndromes in Spain. *Neuromuscul Disord*. 2017 Dec;27(12):1087-1098.

91- Aharoni S, Sadeh M, Shapira Y, Edvardson S, Daana M, Dor-Wollman T, Mimouni-Bloch A, Halevy A, Cohen R, Sagie L, Argov Z, Rabie M, Spiegel R, Chervinsky I, Orenstein N, Engel AG, Nevo Y. Congenital myasthenic syndrome in Israel: Genetic and clinical characterization. *Neuromuscul Disord*. 2017 Feb;27(2):136-140.

92- Parr JR, Andrew MJ, Finnis M, Beeson D, Vincent A, Jayawant S. How common is childhood myasthenia? The UK incidence and prevalence of autoimmune and congenital myasthenia. *Arch Dis Child*. 2014 Jun;99(6):539-42.

93- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*. 2001 Jan;68(1):281-6.

94- Abicht A, Dusl M, Gallenmüller C, Guergueltcheva V, Schara U, Della Marina A, Wibbeler E, Almaras S, Mihaylova V, von der Hagen M, Huebner A, Chaouch A, Müller JS, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndromes: achievements and limitations of phenotype-guided gene-after-gene sequencing in diagnostic practice: a study of 680 patients. Hum Mutat 2012; 33: 1474–1484.

95- Ohno K, Anlar B, Ozdirim E, Brengman JM, DeBleecker JL, Engel AG. Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor. *Ann Neurol*. 1998 Aug;44(2):234-41.

96- Karcagi V, Tournev I, Schmidt C, Herczegfalvi A, Guergueltcheva V, Litvinenko I, Song IH, Abicht A, Lochmuller H. Congenital myasthenic syndrome in southeastern European Roma (Gypsies). *Acta Myologica*. 2001;20:231–8

97- Burke G, Cossins J, Maxwell S, Robb S, Nicolle M, Vincent A, Newsom-Davis J, Palace J, Beeson D. Distinct phenotypes of congenital acetylcholine receptor deficiency. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14(6):356-64.

98- Müller JS, Mildner G, Müller-Felber W, Schara U, Krampfl K, Petersen B, Petrova S, Stucka R, Mortier W, Bufler J, Kurlemann G, Huebner A, Merlini L, Lochmüller H, Abicht A. Rapsyn N88K is a frequent cause of congenital myasthenic syndromes in European patients. *Neurology*. 2003; 60(11):1805-10

99- Chaouch A, Beeson D, Hantaï D, Lochmüller H. 186th ENMC International Workshop: Congenital myasthenic syndromes 24-26 June 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2012a;22:566–76.

100- Milone M, Shen XM, Selcen D, Ohno K, Brengman J, Iannaccone ST, Harper CM, Engel AG. Myasthenic syndrome due to defects in rapsyn. *Neurology* 2009; 73(3): 228–35.

101- McMacken G, Whittaker RG, Evangelista T, Abicht A, Dusl M, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndrome with episodic apnoea: clinical, neurophysiological and genetic features in the long-term follow-up of 19 patients. *J Neurol*. 2018 Jan;265(1):194-203.

102- Rambold H, Sander T, Helmchen C, Heide W. Different types of intra-saccadic slowing in congenital (RAPSN-mutation) and acquired myasthenic syndromes. *Eur J Neurol*. 2006;13(10):e3-4

103- Banwell BL, Ohno K, Sieb JP, Engel AG. Novel truncating RAPSN mutations causing congenital myasthenic syndrome responsive to 3,4-diaminopyridine. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14(3):202-7.

104- Yasaki E, Prioleau C, Barbier J, Richard P, Andreux F, Leroy JP, Dartevelle P, Koenig J, Molgó J, Fardeau M, Eymard B, Hantaï D. Electrophysiological and morphological characterization of a case of autosomal recessive congenital myasthenic syndrome with acetylcholine receptor deficiency due to a N88K rapsyn homozygous mutation. *Neuromuscul Disord*. 2004; 14(1):24-32.

105- Beeson D, Higuchi O, Palace J, Cossins J, Spearman H, Maxwell S, Newsom-Davis J, Burke G, Fawcett P, Motomura M, Müller JS, Lochmüller H, Slater C, Vincent A, Yamanashi Y. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science*. 2006;313:1975–8.

106- Ohno K, Engel AG, Shen XM, Selcen D, Brengman J, Harper CM, Tsujino A, Milone M. Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002; 70(4):875-85.

107- Brugnoni R, Maggi L, Canioni E, Moroni I, Pantaleoni C, D'Arrigo S, Riva D, Cornelio F, Bernasconi P, Mantegazza R. Identification of previously unreported mutations in CHRNA1, CHRNE and RAPSN genes in three unrelated Italian patients with congenital myasthenic syndromes. *J Neurol*. 2010; 257(7):1119-23.

108- Alseth EH, Maniaol AH, Elsais A, Nakkestad HL, Tallaksen C, Gilhus NE, Skeie GO. Investigation for RAPSN and DOK-7 mutations in a cohort of seronegative myasthenia gravis patients. *Muscle Nerve*. 2011; 43(4):574-7.

109- Tsujino A, Maertens C, Ohno K, Shen XM, Fukuda T, Harper CM, Cannon SC, Engel AG. Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10;100(12):7377-82.

110- Arnold WD, Feldman DH, Ramirez S, He L, Kassar D, Quick A, Klassen TL, Lara M, Nguyen J, Kissel JT, Lossin C, Maselli RA. Defective fast inactivation recovery of Nav 1.4 in congenital myasthenic syndrome. *Ann Neurol*. 2015 May;77(5):840-50.

111- Habbout K, Poulin H, Rivier F, Giuliano S, Sternberg D, Fontaine B, Eymard B, Morales RJ, Echenne B, King L, Hanna MG, Männikkö R, Chahine M,

Nicole S, Bendahhou S. A recessive Nav1.4 mutation underlies congenital myasthenic syndrome with periodic paralysis. *Neurology*. 2016 Jan 12;86(2):161-9.

112- Bonanno C, Rodolico C, Töpf A, Foti FM, Liu WW, Beeson D, Toscano A, Lochmüller H. Severe congenital myasthenic syndrome associated with novel biallelic mutation of the CHRND gene. *Neuromuscul Disord*. 2020 Apr;30(4):336-339. doi: 10.1016/j.nmd.2020.02.012. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32360402.

113- Van Regemorter N, Wilkin P, Englert Y, El Khazen N, Alexander S, Rodesch F, Milaire J. Lethal multiple pterygium syndrome. *Am J Med Genet*. 1984 Apr;17(4):827-34. doi: 10.1002/ajmg.1320170412.

114- Shen XM, Fukuda T, Ohno K, Sine SM, Engel AG. Congenital myasthenia-related AChR delta subunit mutation interferes with intersubunit communication essential for channel gating. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1867-76. doi: 10.1172/JCI34527.

115- Michalk A, Stricker S, Becker J, Rupps R, Pantzar T, Miertus J, Botta G, Naretto VG, Janetzki C, Yaqoob N, Ott CE, Seelow D, Wieczorek D, Fiebig B, Wirth B, Hoopmann M, Walther M, Körber F, Blankenburg M, Mundlos S, Heller R, Hoffmann K. Acetylcholine receptor pathway mutations explain various fetal akinesia deformation sequence disorders. *Am J Hum Genet*. 2008 Feb;82(2):464-76. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.11.006. PMID: 18252226

116- Brownlow S, Webster R, Croxen R, Brydson M, Neville B, Lin JP, Vincent A, Newsom-Davis J, Beeson D. Acetylcholine receptor delta subunit mutations underlie a fast-channel myasthenic syndrome and arthrogryposis multiplex congenita. *J Clin Invest*. 2001 Jul;108(1):125-30. doi: 10.1172/JCI12935.

117- Feng H, Zhou H. New compound heterozygous variants of the cholinergic receptor nicotinic delta subunit gene in a Chinese male with congenital myasthenic syndrome: A case report. *Medicine* (Baltimore). 2017 Dec;96(51):e8981. doi: 10.1097/MD.0000000000008981.

118- Engel AG, Shen XM, Selcen D. The unfolding landscape of the congenital myasthenic syndromes. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1413(1):25-34. doi:10.1111/nyas.13539

119- Cabrera-Serrano M, Ghaoui R, Ravenscroft G, et al. Expanding the phenotype of GMPPB mutations. *Brain*. 2015;138(Pt 4):836-844. doi:10.1093/brain/awv013

120- Belaya K, Finlayson S, Cossins J, et al. Identification of DPAGT1 as a new gene in which mutations cause a congenital myasthenic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1275:29-35. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06790.x

121- Finlayson S, Palace J, Belaya K, et al. Clinical features of congenital myasthenic syndrome due to mutations in DPAGT1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(10):1119-1125. doi:10.1136/jnnp-2012-304716

122- Shen XM, Selcen D, Brengman J, Engel AG. Mutant SNAP25B causes myasthenia, cortical hyperexcitability, ataxia, and intellectual disability. *Neurology*. 2014;83:2247–55

Apêndice

Dados de identificadores e alterações moleculares de todos os pacientes

Paciente / Família	Indentificadores RD-connect	Classificação diagnóstica / gene / variante / frequência alélica	Método de diganóstico molecular
1/1#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
2/1#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
3/1#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
4/2#	TOP_ESTE 1880_1	Provável / *CHRNE* p.Y131* (c.393C>G) single hit / NL	SNG
5/2#	TOP_ESTE 1880_2	Provável / *CHRNE* p.Y131* (c.393C>G) single hit / NL	SNG
6/3#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
7/3#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
8/4#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
9/5#	NR	Provável / *CHRNE* p.E44G*3 (c.130dupG)◆ single hit / 10^{-4}	Sanger
10/6	TOP_ESTE1670_1	Não resolvido / - - / -	SNG
11/7	TOP_ESTE1733_1	Não resolvido / - - / -	SNG
12/8#	TOP_ESTE1363_1	Confirmado / *COL13A1* p.P278L*65+p.P278L*65 (c.833delC+c.833delC) / NL+NL	SNG
13/9	NR	Confirmado / *DOK7* p.A378S*30+p.A378S*30◆ (c.1124_1127dupTGCC+ c.1124_1127dupTGCC)/ $7x10^{-4}+7x10^{-4}$	Sanger
14/10	TOP_ESTE1531_1	Não-SMC / *SCN8A* p.R1872Q(c.5615G>A)◆ dominant / $4x10^{-7}$	SNG
15/11	TOP_ESTE475_1	Não resolvido / - - / -	SNG
16/12	TOP_ESTE1712_1	Confirmado / *SCN4A* p.T1719S+p.T163G*10 (c.5156C>G+ c.486_487insGGCG) / NL+NL	SNG
17/13#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
18/14#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.L31P+p.L31P (c.92T>C+c.92T>C)/ NL+NL	Sanger
19/15#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
20/16#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
21/17	TOP_ESTE1706_1	Não-SMC / DHCR7 p.T93M+p.T93M (c.278C>T+c.278C>T)◆ / $5x10^{-5}+5x10^{-5}$	SNG
22/18#	TOP_ESTE1707_1	Confirmado / *COL13A1* p.G163V*32+p.G163V*32 (c.486delT+c.486delT)/ $4x10^{-6}+4x10^{-6}$	SNG
23/19#	TOP_ESTE1668_1	Confirmado / *RAPSN* p.N88K+p.N88K (c.264C>A+c.264C>A)◆ / $10^{-3}+10^{-3}$	SNG
24/20#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
25/21	TOP_ESTE1716_1	Não-SMC / *LDB3* p.L227F+p.L227F (c.679C>T+c.679C>T) / $4x10^{-6}+4x10^{-6}$	SNG
26/22#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
27/23	TOP_ESTE1724_1	Provável / *CHRNE* p.V301M (c.901G>A) single hit / $7x10^{-4}$	SNG

28/24#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
29/25	TOP_ESTE1959_1	Confirmado / *COLQ* c.219+1G>C + c.219+1G>C◆ / $10^{-5}+10^{-5}$	SNG
30/25	TOP_ESTE1959_2	Confirmado / *COLQ* c.219+1G>C + c.219+1G>C◆ / $10^{-5}+10^{-5}$	SNG
31/26#	NR	Confirmado / *RAPSN* p.N88K + p.V165M (c.264C>A+c.493G>A)◆ / $10^{-3}+3x10^{-5}$	Sanger
32/27#	NR	Confirmado / *RAPSN* p.N88K+p.N88K (c.264C>A+c.264C>A)◆ / $10^{-3}+10^{-3}$	Sanger
33/28#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
34/29	TOP_ESTE1867_1	Não resolvido / - - / -	SNG
35/30	TOP_ESTE1953_1	Não resolvido / - - / -	SNG
36/31	TOP_ESTE1902_1	Provável / *CHRND* c.821-448G>C + c.821-448G>C / NL	SNG
37/32#	TOP_ESTE1796_1	Confirmado / *COL13A1* c.549+5G>A + c.549+5G>A / NL + NL	SNG
38/32#	TOP_ESTE1796_2	Confirmado / *COL13A1* c.549+5G>A + c.549+5G>A / NL + NL	SNG
39/33#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3 + c.803-2A>G (c.130dupG◆ + c.803-2A>G◆) / $10^{-4}+2x10^{-5}$	Sanger
40/33#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3 + c.803-2A>G (c.130dupG◆ + c.803-2A>G◆) / $10^{-4}+2x10^{-5}$	Sanger
41/34#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
42/35#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.L287S *14 (c.130dupG◆ + c.858_859dup◆) / 10^{-4} + NL	Sanger
43/35#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.L287S *14 (c.130dupG◆ + c.858_859dup◆) / 10^{-4} + NL	Sanger
44/36	TOP_ESTE1384_1	Não resolvido / - - / -	SNG
45/37	TOP_ESTE1952_1	Não resolvido / - - / -	SNG
46/38	TOP_ESTE2001_1	Confirmado / *CHAT* p.L655P + p.E382G (c.1964T>C + c.1145A>G) / NL + NL	SNG
47/39	TOP_ESTE2035_1	Confirmado / *DOK7* p.A378S*30+p.L454P*60 (c.1124_1127dupTGCC◆ + c.1357_1370del14◆)/ $7x10^{-4}$ + NL	SNG
48/40#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
49/41#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
50/41#	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / $10^{-4}+10^{-4}$	Sanger
51/42	NR	Confirmado / *DOK7* p.A378S*30 + p.A378S*30◆ / (c.1124_1127dupTGCC+ c.1124_1127dupTGCC)/$7x10^{-4}+7x10^{-4}$	Sanger
52/43	TOP_ESTE2076_1	Não-SMC / *VWA3B* p.G31K+p.R932H (c.91C>A + c.2795G>A) / $2x10^{-4}+2x10^{-4}$	SNG
53/44	TOP_ESTE2072_1	Não resolvido / - - / -	SNG
54/45	TOP_ESTE2132_1	Não resolvido / - - / -	SNG
55/46	TOP_ESTE2159_1	Não resolvido / - - / -	SNG
56/47	TOP_ESTE2174_1	Não resolvido / - - / -	SNG
57/48	TOP_ESTE2177_1	Não resolvido / - - / -	SNG
58/49	TOP_ESTE2167_1	Não-SMC / *PTPN11* p.Y63C (c.188A>G)◆ (dominant)/ 10^{-5}	SNG
59/ 50	TOP_ESTE2201_1	Provável / *SCN4* p.T231M+ p.*1837Yext*50 (c.692C>T + c.5511G>C) /10^{-5}+NL	SNG
60/51#	NR	Confirmado / *CHRNA1* p.G466R + p.G466R (c.1396G>A+c.1396G>A)◆ / $4x10^{-5}+4x10^{-5}$	SNG
61/52	NR	Confirmado / *COLQ* c.219+1G>C◆ + P.L53P*81 (c.219+1G>C + c.158insC) / 10^{-5}	SNG

		+4x10^{-6}	
62/53	NR	Confirmado / *RAPSN* p.N88K + p.R164G (c.264C>A◆ + c.490C>G) / 10^{-3} + NL	SNG
63/54	NR	Confirmado / *GMPPB* p.P32L+p.D27H (c.95C>T◆ + c.79G>C◆) / 6x10^{-4}+8x10^{-5}	SNG
64/55	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / 10^{-4} + 10^{-4}	Sanger
65/55	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / 10^{-4} + 10^{-4}	Sanger
66/56	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / 10^{-4} + 10^{-4}	Sanger
67/57	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / 10^{-4} + 10^{-4}	Sanger
68/58	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / 10^{-4} + 10^{-4}	Sanger
69/59	TOP_ESTE2588_1	Não resolvido / - - / -	SNG
70/60	TOP_ESTE2472_1	Provável / *RAPSN* p.S398S+p.D78V (c.1194C>T + c.233A>T) / 3x10^{-5} + NL	SNG
71/61	TOP_ESTE2282_1	Não resolvido / - - / -	SNG
72/62	TOP_ESTE2531_1	Confirmado / *CHRNE* p.P41L+p.P41L (c.122C>T + c.122C>T) / 4x10^{-6} + 4x10^{-6}	SNG
73/63	TOP_ESTE2390_1	Não resolvido / - - / -	SNG
74/64	TOP_ESTE2519_1	Não resolvido / - - / -	SNG
75/65	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / 10^{-4} + 10^{-4}	Sanger
76/65	NR	Confirmado / *CHRNE* p.E44G*3+p.E44G*3 (c.130dupG+c.130dupG)◆ / 10^{-4} + 10^{-4}	Sanger
77/66	NR	Confirmado / *RAPSN* p.N88K+p.Q21* (c.264C>A◆ + c.61C>T) / 10^{-3} + NL	SNG
78/67	NR	Confirmado / *GFPT1* p.S218P+p.A92V (c.652T>G + c.275C>T) / NL + NL	SNG
79/68	NR	Confirmado / *GFPT1* p.D459N+p.L23V (c.1375G>A + c.67C>G) / NL + NL	SNG

Tabela do apêndice. NR = não registrado; SNG = sequenciamento de nova geração; NL = não listada no banco de variantes gnomAD; ◆□□□previamente descrito como patogênica. # = casos publicados na literatura. Frequência alélica de acordo com gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/).

Artigo em processo de submissão

Autores: Eduardo de Paula Estephan; Antonio Alberto Zambon; Rachel Thompson; Kiran Polavarapu; Danny Jomaa; Ana Töpf; Paulo Victor Partezani Helito; Carlos Otto Heise; Cristiane Araújo Martins Moreno; André Macedo Serafim Silva; Joao Aris Kouyoumdjian; Maria da Penha Morita; Umbertina Conti Reed; Hanns Lochmüller; Edmar Zanoteli

Periódico: a ser definido

Título: Congenital myasthenic syndrome: correlation between clinical features and molecular diagnosis in a large case series

Resumo: Objectives: to present phenotype features of a large cohort of congenital myasthenic syndromes (CMS) and correlate them with their molecular diagnosis. Methods: suspected CMS patients were divided into three groups: group A [limb, bulbar or axial weakness, with or without ocular impairment, and all the following: clinical fatigability, electrophysiology compatible with neuromuscular junction (NMJ) involvement and anticholinesterase agents response], group B [limb, bulbar or axial weakness, with or without ocular impairment, and at least one of additional characteristics noted in group A] and group C [pure ocular syndrome]. Then, clinical findings were compared with groups of confirmed, probable, and unsolved genetic diagnosis. Results: Seventy-nine patients (68 families) were included in the cohort: 48 in group A, 23 in group B, and 8 in group C. Fifty-one were considered confirmed CMS (30 CHRNE, 5 RAPSN, 4 COL13A1, 3 DOK7, 3 COLQ, 2 GFPT1, 1 CHAT, 1 SCN4A, 1 GMPPB, 1 CHRNA1), seven probable CMS, five non-CMS, and 16 unsolved. The chance of a confirmed molecular diagnosis of CMS was significantly higher for group A and lower for group C. Several clinical findings were found to enhance the specificity for CMS, notably limb, masticatory, and facial weakness, muscle alteration on biopsy, and electrophysiological NMJ alteration. Muscle imaging showed preferential involvement of soleus. Besides, ocular movement impairment sparing down gaze was a frequent feature of CMS. Conclusions: Stricter clinical criteria increase the chance to confirm CMS diagnosis genetically and pure ocular syndrome appears not to be a usual CMS phenotype.