



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Síndromes Miasténicos Congénitos en Población Española: Caracterización Clínica, Genética y de su Respuesta Terapéutica

Daniel Natera de Benito

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA:
CARACTERIZACIÓN CLÍNICA, GENÉTICA Y RESPUESTA TERAPÉUTICA

DANIEL NATERA DE BENITO

TESIS DOCTORAL

2017

DIRECTOR: JAUME COLOMER OFERIL

Los Dres Jaime Colomer Oferil y Andrés Nascimento Osorio, Jefes de la Unidad de Tratamiento Integral del paciente Neuromuscular (UTIN) del Hospital Sant Joan de Déu

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Síndromes Miasténicos Congénitos en Población Española: Caracterización Clínica, Genética, Electrofisiológica y de su Respuesta Terapéutica”, presentada por D Daniel Natera de Benito, ha sido realizada bajo nuestra supervisión y cumple con los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, donde proceda se firma este certificado en Barcelona, 10 de Mayo de 2017.

Dr Jaime Colomer Oferil

Dr Andrés Nascimento Osorio

Para Jana, por todo.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no hubiera podido llevarse a cabo sin la inestimable ayuda y colaboración de muchas personas que han aportado sus esfuerzos en los diferentes trabajos de investigación que conforman esta tesis, a todos ellos quisiera expresarles mi más sincera gratitud.

En primer lugar, quisiera dar mi agradecimiento a mi director de tesis, el Doctor Jaume Colomer Oferil, no solo por su ayuda y orientación durante la elaboración de este trabajo sino, sobre todo, por ser para mí un referente por su rigor científico, dedicación, humildad, honradez y pasión por aprender.

Al Doctor Andrés Nascimento, por ser la mente pensante de la que surgió y creció este proyecto. Un generador constante de nuevas ideas y un líder al que siempre he podido acudir para orientar cada una de las investigaciones. Sin su capacidad de motivación y positivismo no habría sido posible este proyecto.

Al Doctor Carlos Orteza quisiera agradecerle su continua disponibilidad y su clarividencia, siendo capaz de explicar lo más complejo de la forma más sencilla y humilde. Conocerle y poder trabajar a su lado es un privilegio.

Al Doctor Juan Jesús Vilchez, por su apoyo desinteresado desde el primer momento y su generosa predisposición para trabajar en equipo sin esperar nada a cambio.

Al equipo del Muscle Centre de Newcastle y muy especialmente a los Doctores Hanns Lochmüller y Ana Töpf, por sus aportaciones siempre inteligentes y por su implicación en nuestros proyectos, que son también los suyos.

A todos los neuropediatras y neurólogos españoles que han colaborado en este proyecto, demostrando que juntos somos más.

No me puedo olvidar de mis mentores en la Neurología Infantil, los Doctores Asunción García Pérez y Miguel Ángel Martínez Granero. Ellos fueron los que me guiaron y me permitieron dar los primeros pasos en esta pasión que es la Neurología Infantil. Decir que son mi madre y mi padre a nivel profesional se queda corto.

Por último, a todos los pacientes, por su ejemplo diario de sacrificio al afrontar la vida, con ilusión y esperanza. Son ellos los que nos enseñan a diario y los que nos motivan para poder realizar esta labor ardua y a la vez esperanzadora, que es la de tratar de devolverles, mediante el diagnóstico y el tratamiento, algo de todo lo que ellos nos ofrecen.

ABREVIATURAS

3-4 DAP	3,4-Diaminopiridina
6MWT	6-minute walking test
AChE	Acetilcolinesterasa
AChR	Receptor de acetilcolina
anti-AChR	Anticuerpos anti receptor de acetilcolina
anti-MuSK	Anticuerpos anti tirosin kinasa musculo específica
CDG	Trastornos congénitos de la glicosilación de proteínas
CK	Creatinquinasa
CMAP	Potencial de acción muscular
EMG	Electromiograma
HGMD	Human Gene Mutation Data
Hz	Hertzio
IACHÉ	Inhibidores de acetilcolinesterasa, anticolinesterásicos
IMAO	Inhibidores de la monoaminoxidasa
LMOD3	Lelomodina 3
LOVD	Leiden Open Variation Database
MN	Miopatía nemalínica
MRC	Medical Research Council
NEB	Nebulina
NGS	Next generation sequencing
SCL	Síndrome de canal lento
SCR	Síndrome de canal rápido
SMC	Síndrome miasténico congénito
UCI-N	Unidad de cuidados intensivos neonatales

RESUMEN

Los síndromes miasténicos congénitos (SMC) constituyen un grupo clínicamente heterogéneo de enfermedades de causa genética. Se caracterizan por presentar alteraciones en la transmisión neuromuscular por defectos en proteínas localizadas en la unión neuromuscular. Se han descrito hasta el momento 28 genes implicados. Una elevada proporción de pacientes con cuadros clínicos de fatigabilidad permanecen sin diagnóstico genético, lo que sugiere la implicación de otros genes todavía hoy desconocidos.

Conocer la repercusión y funcionalidad de la proteína deficitaria en cada uno de los subtipos de miastenia congénita es esencial para la selección del tratamiento. El tratamiento óptimo de los diversos cuadros clínicos se basa en el conocimiento fisiopatológico, y la caracterización clínica, genética y funcional de las diversas mutaciones sobre la transmisión neuromuscular. A pesar de los avances en el conocimiento de esta patología, hasta el momento no se había llevado a cabo en nuestro país un estudio epidemiológico que permitiera caracterizar los SMC.

Para estudiar las alteraciones genéticas más frecuentes en nuestro medio y definir las características clínicas y la respuesta terapéutica de cada uno de los subtipos de SMC hemos recogido los datos clínicos, neurofisiológicos y anatomopatológicos de 64 pacientes con diagnóstico genético de SMC. Adicionalmente, se incluye el primer caso descrito de una paciente con una miopatía congénita nemalínica por mutaciones en *KLHL40* con probable afectación de la transmisión neuromuscular y respuesta clínica positiva a tratamientos habitualmente empleados en el tratamiento de patologías de la unión neuromuscular.

Nuestros resultados muestran que los genes que presentan mutaciones con mayor frecuencia en población española con SMC son *CHRNE* y *RAPSN*. Las mutaciones más frecuentes en España son: *CHRNE* c.130insG (Glu44Glyfs*3), *CHRNE* c.1353insG (p.Asn542Glu*4), *RAPSN* c.264C>A (p.Asn88Lys), *DOK7* c.1124_1127dup (p.Ala378Serfs*30) y *COLQ* c.1289A>C (p.Tyr430Ser). Asimismo, la mutación *CHRNE* c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64) es especialmente frecuente en población española de etnia gitana.

Con nuestra serie de pacientes hemos identificado algunas correlaciones genotipo-fenotipo de relevancia para la práctica clínica. Manifestaciones como la ptosis, la clínica bulbar, la oftalmoplejia, la debilidad cervical y la debilidad de cinturas son más frecuentes en algunos subtipos de SMC que en otros. La edad de inicio, la respuesta al tratamiento y el curso de la enfermedad a largo plazo también varían en función del gen implicado.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiii
I INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia.....	1
1.2. Prevalencia	3
1.3 Patogenia	3
1.4 Clasificación.....	7
1.5 Clínica.....	8
1.6 Diagnóstico.....	13
1.6.1 Signos, síntomas y otros datos de sospecha de SMC.....	13
1.6.2 Pruebas complementarias en SMC.....	14
1.6.3 Estudio genético en pacientes con sospecha clínica de SMC.....	16
1.7 Tratamiento.....	17
1.7.1 Abordaje terapéutico de los SMC presinápticos	22
1.7.2 Abordaje terapéutico de los SMC sinápticos	23
1.7.3 Abordaje terapéutico de los SMC postsinápticos.....	24
1.8 SMC por defectos congénitos de la glicosilación de proteínas.....	27
<i>GFPT1</i>	28
<i>DPAGT1</i>	28
<i>ALG2</i> y <i>ALG14</i>	29
<i>GMPPB</i>	30
1.9 Miopatías congénitas con alteraciones secundarias a nivel de la unión neuromuscular	31
II JUSTIFICACIÓN	33
III OBJETIVOS.....	35
IV MATERIAL Y MÉTODOS	37
V RESULTADOS	41
V.1 ESTUDIO 1: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN ESPAÑA.....	41

V.1.1 Resultados genéticos de los síndromes miasténicos congénitos en España.	42
V.1.2 Resultados clínicos de los síndromes miasténicos congénitos en España.	48
V.2 ESTUDIO 2: SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO DE PACIENTES CON SÍNDROME MIASTÉNICO CONGÉNITO POR MUTACIONES EN <i>RAPSN</i>	57
V.2.1 Edad de debut de los SMC por <i>RAPSN</i> y fenotipo clínico.....	57
V.2.2 Evaluación electrofisiológica, pruebas de laboratorio y estudios de anatomía patológica en pacientes con SMC por <i>RAPSN</i>	60
V.2.3 Genética molecular de la muestra de pacientes con SMC por <i>RAPSN</i>	61
V.3 ESTUDIO 3: HETEROGENEIDAD EN EL FENOTIPO DE PACIENTES DE DOS FAMILIAS ROMANÍES CON SÍNDROME MIASTÉNICO CONGÉNITO POR LA MUTACIÓN <i>CHRNE</i> 1267delG. UN SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO	63
V.3.1 Edad de debut y fenotipo clínico de pacientes con SMC por mutación <i>CHRNE</i> 1267delG en homocigosis.....	64
V.3.2 Estudios neurofisiológicos y de laboratorio en pacientes con SMC por mutación <i>CHRNE</i> 1267delG en homocigosis	65
V.3.3 Respuesta al tratamiento en pacientes con SMC por mutación <i>CHRNE</i> 1267delG en homocigosis	66
V.3.4 Casos representativos de pacientes con SMC por mutación <i>CHRNE</i> 1267delG en homocigosis con un curso clínico progresivo y/o fluctuante	67
V.4 ESTUDIO 4: MIOPATÍA NEMALÍNICA POR <i>KLHL40</i> CON UNA RESPUESTA POSITIVA Y MANTENIDA A TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTICOLINESTERÁSICOS.....	69
VI DISCUSIÓN	75
VI.1 PREVALENCIA DE LOS SMC EN ESPAÑA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS DIVERSOS SUBTIPOS DE SMC.....	77
VI.2 Correlación entre las alteraciones genéticas responsables de los diversos SMC y el fenotipo clínico, electrofisiológico y anatomopatológico	81
VI.3 Correlación entre la respuesta a los diversos tratamientos farmacológicos y el defecto genético identificado en los diferentes SMC.....	89
VI.4 Descripción de las características clínicas, genéticas, neurofisiológicas y de respuesta al tratamiento con un seguimiento a largo plazo en pacientes con SMC causado por mutaciones en <i>RAPSN</i>	91
VI.5 Descripción de la variabilidad fenotípica en una cohorte de pacientes con SMC por una misma mutación en <i>CHRNE</i> : c.1327delG, p.Glu443Lysfs*64	95
VI.6 Descripción de pacientes con miopatía congénita con afectación secundaria de la unión neuromuscular en los que existe respuesta franca a anticolinesterásicos.....	99

VII CONCLUSIONES	103
VIII BIBLIOGRAFÍA	107
IX PUBLICACIONES ORIGINALES	120
ANEXO 1 Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic síndrome due to <i>RAPSN</i> mutations	123
ANEXO 2 Phenotypic heterogeneity in two large Roma families with a congenital myasthenic syndrome due to <i>CHRNE</i> 1267delG mutation. A long-term follow-up.....	133
ANEXO 3 <i>KLHL40</i> -related nemaline myopathy with a sustained, positive response to treatment with acetylcholinesterase inhibitors.....	143

I INTRODUCCIÓN

Los síndromes miasténicos congénitos (SMC) constituyen un grupo clínicamente heterogéneo de enfermedades de causa genética [Abicht *et al.*, 2003; Beeson, 2016; Engel *et al.*, 2015]. Se caracterizan por la presencia de una alteración en la transmisión neuromuscular, secundaria a defectos localizados en proteínas que intervienen en el correcto funcionamiento de la placa motora [Abicht *et al.*, 2003; Beeson, 2016; Chaouch *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2015; Hantai *et al.*, 2013; Rodríguez Cruz *et al.*, 2014a]. En los últimos años se han identificado numerosas proteínas y genes implicados, habiéndose descrito hasta el momento 27 genes cuya alteración da lugar a defectos en la transmisión neuromuscular y, por tanto, a un SMC [Beeson, 2016; Schara *et al.*, 2012].

1.1. HISTORIA

La primera descripción de una mutación patogénica causante de un SMC se produjo en 1995, localizándose en el gen *CHRNE* [Ohno *et al.*, 1995], que codifica para la subunidad epsilon del receptor de acetilcolina. Previamente los pacientes que padecían estos síndromes eran incluidos dentro de los grupos de las “miastenias gravis neonatales” o “miastenias seronegativas”. Durante los años sucesivos se han venido describiendo mutaciones en un número creciente de genes [Aran *et al.*, 2017; Bauché *et al.*, 2016; O’Connor *et al.*, 2016] (**Tabla 1**) y en los últimos años hemos asistido a un enorme avance en el conocimiento de estos síndromes. Cada vez es mayor la proporción de pacientes con cuadros clínicos de miastenia en los que se consigue identificar la alteración genética causante de la enfermedad. Paralelamente, cada vez se conoce mejor

SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

la función de cada una de las proteínas codificadas por estos genes a nivel de la unión neuromuscular.

Gen	Síndrome
Síndromes presinápticos	
<i>CHAT</i>	Déficit de colina acetiltransferasa
<i>SYT2</i>	Déficit de sinaptotagmina
<i>SNAP25</i>	Déficit de SNAP25B
<i>SLC18A3</i>	Déficit de transportador de vesículas de acetilcolina
<i>SLC5A7</i>	SLC5A7
<i>MYO9A</i>	MYO9A
Síndromes sinápticos	
<i>COLQ</i>	Déficit de acetilcolinesterasa
<i>LAMB2</i>	Déficit de B-2 laminina
<i>AGRN</i>	Agrina
<i>COL13A1</i>	Colágeno 13A1
Síndromes postsinápticos	
<i>CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE</i>	Defecto primario del receptor de acetilcolina
<i>CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE</i>	Defecto cinético del receptor de acetilcolina (Síndromes de canal rápido y canal lento)
<i>CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE</i>	Síndrome de Escobar
<i>CHRNG</i>	Síndrome de Escobar
<i>RAPSN</i>	Rapsina
<i>DOK7</i>	Dok-7
<i>MUSK</i>	MuSK
<i>LRP4</i>	LRP4
<i>PLEC</i>	Plectina
<i>COL13A1</i>	Defecto del Colágeno XIII
<i>SCN4A</i>	Miastenia por defecto en el canal de sodio
Defectos congénitos de la glicosilación de proteínas	
<i>GFPT1</i>	GFPT1
<i>DPAGT1</i>	DPAGT1
<i>ALG2</i>	ALG2
<i>ALG14</i>	ALG14
<i>GMPPB</i>	GMPPB
Otros SMC	
<i>PREPL</i>	Defecto en PREPL

Tabla 1. Subtipos de SMC y gen implicado en cada uno de ellos (adaptado y actualizado de Engel *et al.*, 2015).

1.2. PREVALENCIA

La prevalencia de los SMC todavía no se conoce con precisión. Existen relativamente pocos estudios de prevalencia, limitados a áreas geográficas concretas [Aharoni *et al.*, 2016; Mihaylova *et al.*, 2010; Parr *et al.*, 2014]. Probablemente se encuentren infradiagnosticados ya que, hasta hace poco, no todos los cuadros miasteniformes seronegativos se estudiaban genéticamente. En Reino Unido se detectó una prevalencia de 9,2 casos por millón de habitantes [Parr *et al.*, 2014]. Hace cinco años se calculaba que el 50% de los pacientes con sospecha clínica de SMC no llegaba a diagnosticarse genéticamente [Abicht *et al.*, 2012]. Es probable que la prevalencia de pacientes con diagnóstico genético aumente en un futuro, gracias a la generalización del empleo de técnicas de secuenciación masiva.

1.3 PATOGENIA

La unión neuromuscular tiene tres componentes básicos: 1) el terminal nervioso motor presináptico, 2) el espacio sináptico y 3) la membrana muscular postsináptica (**Figura 1**). La acetilcolina es sintetizada en una reacción regulada por la enzima colina acetiltransferasa, codificada por el gen *CHAT*. La posterior liberación de acetilcolina a nivel del terminal nervioso es desencadenada por un estímulo nervioso propagado a lo largo del nervio motor que genera la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes, produciéndose la entrada de calcio dentro del terminal nervioso y la consiguiente excitación de las cuantas de acetilcolina al espacio sináptico. La acetilcolina se une a sus receptores, localizados en la membrana muscular postsináptica. Los receptores de acetilcolina en adultos están formados por cuatro subunidades (alfa, beta, delta y épsilon; codificadas respectivamente por los genes *CHRNA1*, *CHRN1*,

CHRND y *CHRNE*). La subunidad gamma está codificada por el gen *CHRNG*, está presente exclusivamente durante el periodo prenatal y es sustituida entre la semana 32 del periodo gestacional y las primeras semanas de vida por la subunidad epsilon (**Figura 2**). La función de la rapsina, codificada por el gen *RAPSN*, es mantener correctamente agrupados a los receptores para que la concentración de los mismos sea adecuada. La unión de la acetilcolina con su receptor genera un potencial en miniatura o “potencial de placa” y cuando este potencial alcanza un umbral crítico, los canales de sodio voltaje-dependientes se abren y se produce la propagación del potencial de acción longitudinalmente a lo largo de la fibra muscular y transversalmente a través de los túbulos T. En los túbulos T se encuentran los receptores de dihidropiridinas, cuya función está regulada por el potencial de membrana, que inducen un cambio en su conformación que se transmite a los receptores de rianodina 1. El acoplamiento estructural entre los receptores de dihidropiridinas y los de rianodina constituye las unidades funcionales liberadoras de Ca^{2+} , las cuales se activan en su mayoría de manera simultánea en respuesta a un potencial de acción. La activación de los receptores de rianodina 1 genera la salida de Ca^{2+} al citoplasma. La interacción del Ca^{2+} con la troponina C suspende la inhibición que la troponina I y la tropomiosina ejercen sobre la interacción actina-miosina, lo que permite el deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos y genera finalmente la contracción muscular [Verschuuren *et al.*, 2016].

Por otro lado, la acetilcolina se disocia de su receptor por la acción catalítica de la acetilcolinesterasa, localizada en el espacio sináptico. De este modo, se repolariza la membrana y pueden transmitirse los sucesivos estímulos nerviosos. Defectos en el gen

COLQ, que codifica la cola de colágeno de la acetilcolinesterasa, darán lugar a un SMC donde existirá un exceso de acetilcolina en el espacio sináptico.

Además, existen numerosas proteínas que juegan un papel relevante en el anclaje del receptor de acetilcolina a nivel de la membrana postsináptica, como DOK7 (downstream of tyrosine kinase 7), MuSK (muscle-specific kinase) o LRP4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4).

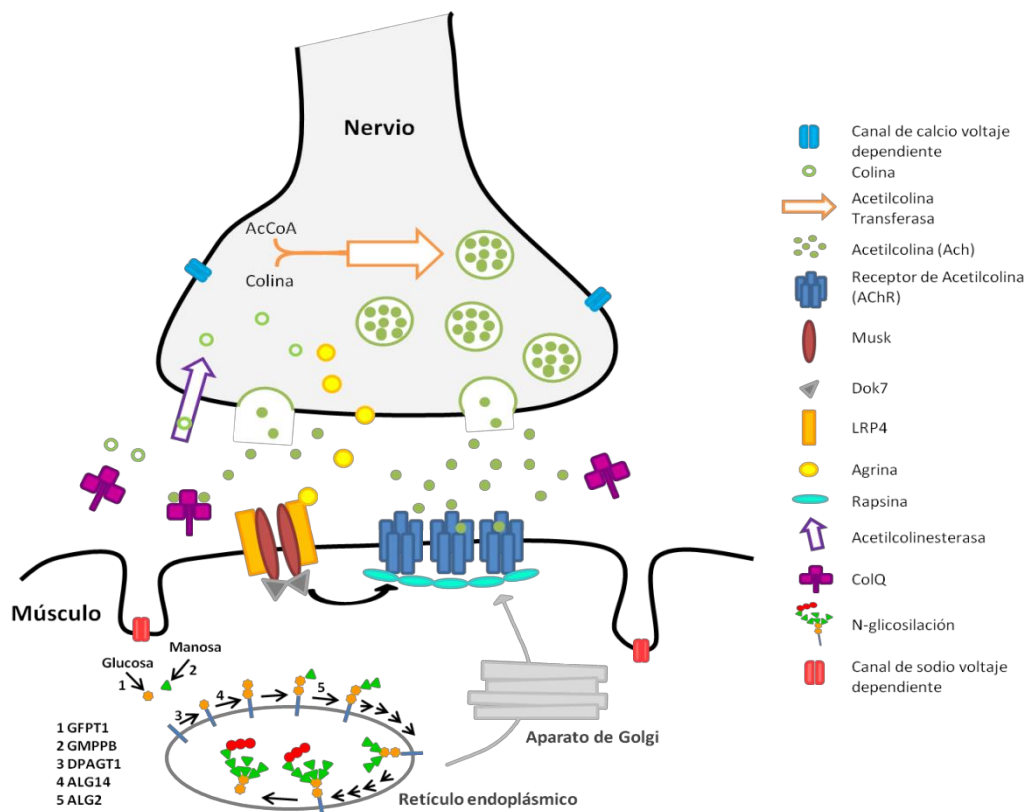


Figura 1. Representación esquemática de la unión neuromuscular y de las principales proteínas relacionada con SMC (modificado de Rodríguez-Cruz *et al.*, 2014a).

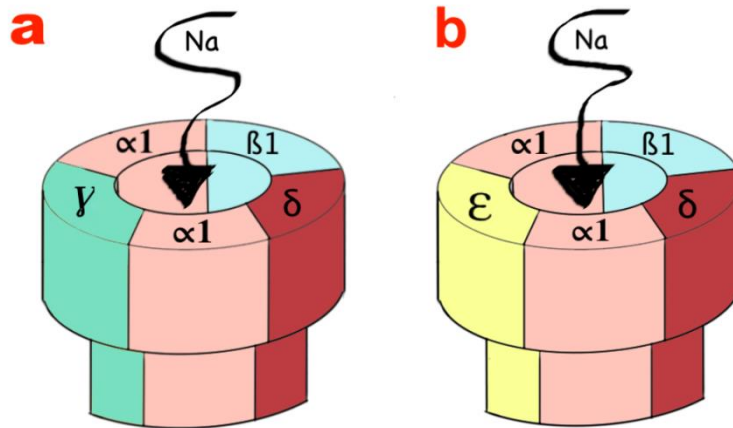


Figura 2. Subunidades del receptor de acetilcolina en el adulto y en el periodo fetal. **a.** Receptor de acetilcolina en el periodo fetal formado por dos subunidades alfa, una beta, una delta y una gamma ($\alpha_2\beta_1\delta\gamma$) **b.** Receptor de acetilcolina en el adulto formado por dos subunidades alfa, una beta, una delta y una epsilon ($\alpha_2\beta_1\delta\epsilon$).

Existen varios mecanismos que pueden comprometer el margen de seguridad de la transmisión neuromuscular en los SMC [Abicht *et al.*, 2003; Engel *et al.*, 2015; Hantai *et al.*, 2013; Rodríguez Cruz *et al.*, 2014a]:

- Defecto en la síntesis o almacenamiento de las cuantas de acetilcolina en las vesículas sinápticas.
- Defectos en la liberación de acetilcolina en el nervio terminal, mediada por calcio.
- Alteración en la eficacia de la cuanta liberada para generar una despolarización postsináptica. Esta eficacia dependerá 1) de la geometría de la

placa terminal, 2) de la densidad y estado funcional de la acetilcolinesterasa en el espacio sináptico, 3) de la densidad, afinidad por la acetilcolina y propiedades cinéticas del receptor de la acetilcolina y 4) de la densidad y las propiedades cinéticas del canal de sodio voltaje-dependiente de la membrana postsináptica.

1.4 CLASIFICACIÓN

La clasificación de los SMC se ha establecido clásicamente en función de la localización de la proteína alterada dentro de la unión neuromuscular (**Figura 1**). De este modo, los subtipos de SMC se han dividido en presinápticos, sinápticos y postsinápticos. En 2011 se añadió un cuarto grupo, constituido por trastornos congénitos de la glicosilación de proteínas (CDG) que dan lugar a alteraciones en los mecanismos responsables del mantenimiento y desarrollo de la placa motora [Belaya *et al.*, 2012; Belaya *et al.*, 2015; Cossins *et al.*, 2013; Engel *et al.*, 2012b; Guerguelcheva *et al.*, 2012; Klein *et al.*, 2015; Montagnese *et al.*, 2017; Rodríguez Cruz *et al.*, 2016; Selcen *et al.*, 2013] (**Tabla 1**).

El subgrupo más prevalente es el de los SMC causados por alteraciones en las proteínas postsinápticas, seguido por el subgrupo compuesto por aquellos SMC debidos a defectos en las proteínas de la lámina basal sináptica y, en tercer lugar, los SMC por alteraciones en las proteínas presinápticas y los SMC por trastornos de la glicosilación de proteínas. La prevalencia de cada subtipo de SMC varía en función de la fuente consultada y según las distintas poblaciones [Aharoni *et al.*, 2016; Mihaylova *et al.*, 2010; Parr *et al.*, 2014]. En cualquier caso, todas las series publicadas coinciden en

señalar a los subtipos relacionados con mutaciones en los genes *CHRNE*, *RAPSN*, *DOK7*, *CHAT*, *COLQ* y *GFPT1* como los más prevalentes.

1.5 CLÍNICA

Los SMC presentan algunas características clínicas generales que son válidas para la mayoría de los casos. No obstante, el fenotipo es diferente según el gen afectado. En términos generales, los SMC se caracterizan por la presencia de fatigabilidad muscular (ocular, bulbar, cinturas...), con o sin debilidad asociada. Podemos definir fatigabilidad como una “disminución en la capacidad de contracción muscular de carácter transitorio o funcional, desencadenada por diversas causas, siendo la más frecuente el ejercicio físico”, mientras que la debilidad puede ser definida como “un estado o alteración persistente en la contracción muscular, generalmente debida a alteraciones estructurales de la membrana o del sarcómero”. En ocasiones puede ser difícil diferenciar una debilidad de una fatigabilidad. No obstante, es fundamental llevar a cabo un intento de diferenciación ya que el enfoque diagnóstico será totalmente distinto.

El debut clínico de los SMC se produce durante el periodo neonatal o durante la infancia en la mayoría de los casos, aunque en algunos subtipos la sintomatología puede no aparecer hasta la segunda década de la vida o, incluso, hasta la edad adulta. La musculatura cardíaca y visceral se encuentra preservada. La gravedad del cuadro y el curso de la enfermedad son muy variables, desde una sintomatología leve hasta cuadros de debilidad progresiva e incapacitante. En algunos subtipos de SMC la sintomatología puede ser leve, pero con exacerbaciones agudas en forma de debilidad o dificultad

respiratoria, desencadenadas frecuentemente por fiebre o infecciones [Engel *et al.*, 2015; Finlayson *et al.*, 2013].

De forma general, los síntomas más frecuentes cuando el debut de un SMC se produce durante el periodo neonatal son hipotonía, dificultades para la succión, llanto débil, ptosis palpebral, debilidad generalizada, insuficiencia respiratoria y apneas. Cuando la sintomatología aparece ya desde el periodo prenatal puede existir un síndrome de artrogriposis múltiple congénita o pterigium múltiple, secundario a la escasa movilidad articular del feto. Los SMC que debutan durante la infancia tardía tienen como síntomas y signos de presentación más frecuentes la fatigabilidad y la dificultad para correr o subir escaleras (secundaria a una debilidad de cinturas), una ptosis palpebral fluctuante y limitación en los movimientos oculares de carácter fijo o fluctuante, con empeoramiento vespertino o relacionado con la actividad física y mejoría relativa o recuperación tras el reposo. La adquisición de los hitos del desarrollo motor puede estar retrasada.

Aunque, como hemos mencionado, existen características clínicas que son típicas de los SMC en general, no es menos cierto que la heterogeneidad clínica entre los distintos subtipos de SMC es grande. En los últimos años se han ido definiendo los fenotipos de los diversos subtipos de SMC con mayor precisión y se han reconocido signos guía específicos de subtipos concretos. Estos signos guía son útiles para el clínico ya que pueden ser empleados como claves para orientar el diagnóstico genético, así como para establecer un plan de seguimiento de la evolución clínica del paciente y poder ofrecer un pronóstico. Algunos de los signos guía más útiles son los siguientes:

- La presencia de **apneas** en un neonato hará sospechar un SMC por mutaciones en *RAPSN*, especialmente si se asocia con ptosis a lo largo de la evolución clínica [Milone *et al.*, 2009; Visser *et al.*, 2017]. La segunda opción más frecuente es el SMC por mutaciones en *CHAT* [Dilena *et al.*, 2014; Ohno *et al.*, 2001; Schara *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2011]. Otra opción a considerar, especialmente si la ptosis se acompaña en el neonato de oftalmoplejia importante y un cuadro grave de debilidad generalizada, es un síndrome de canal rápido [Palace *et al.*, 2012b; Webster *et al.*, 2014]. El gen *SLC5A7*, recientemente descrito, también asocia clínica de apneas [Bauché *et al.*, 2016].
- Ante un fenotipo con clínica de **debilidad de cinturas**, la primera opción diagnóstica a considerar será un SMC causado por mutaciones en *DOK7*, especialmente si el cuadro clínico se acompaña de una debilidad de la musculatura facial [Evangelista *et al.*, 2015; Gallenmüller *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2007; Palace, 2012a]. Generalmente sin ptosis u oftalmoplejia.
- Si se trata de un cuadro de fatigabilidad desde la infancia, con **ptosis** y **oftalmoplejia**, la opción diagnóstica más probable sería una alteración de la subunidad épsilon del AchR por mutaciones en el gen *CHRNE*, por ser el cuadro clínico que más frecuentemente se presenta con oftalmoplejia [Müller *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2007].

Determinadas **características neurofisiológicas** pueden orientar el diagnóstico hacia unos subtipos de SMC y no hacia otros. La presencia de un doble potencial tras el

estímulo único en la neurografía motora hará sospechar un SMC por *COLQ* [Donger *et al.*, 1998; Ohno *et al.*, 1998] o un SMC tipo síndrome de canal lento (SCL) (**Figura 3**) por alteración de alguna de las subunidades del receptor de acetilcolina: *CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRND* o *CHRNE* [Chaouch *et al.*, 2012b; Engel *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1996]. Si, en cambio, hay una respuesta incremental en la amplitud del potencial de acción se sospechará la presencia de un SMC por *SYT2* [Herrmann *et al.*, 2014; Whittaker *et al.*, 2015] o una patología presináptica, en particular cuando la “potenciación” se produce con altas frecuencias de estímulo.

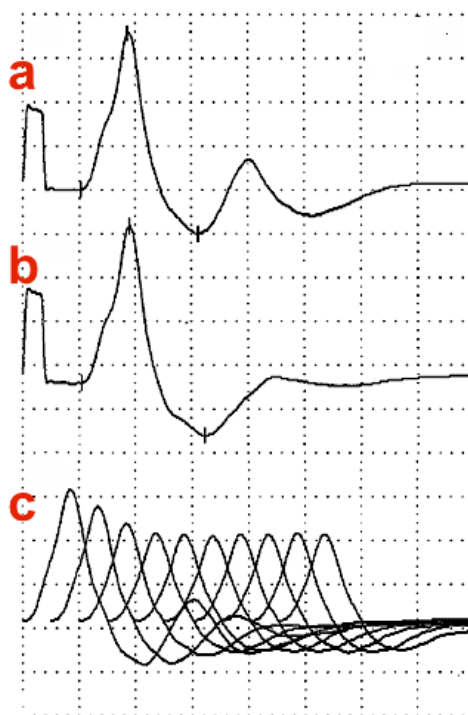


Figura 3. Representación esquemática de los hallazgos electrofisiológicos más característicos en los SMC. a) Doble potencial de acción tras estimulación única en paciente con un SMC por déficit de acetilcolinesterasa por mutaciones en *COLQ*. b) El potencial de acción repetitivo desaparece tras realizar una breve contracción voluntaria del músculo c) Decremento del potencial de acción (con disminución de más del 10% de amplitud entre el primer y el quinto potencial) al estimular con bajas frecuencias, de 3 Hz.

La respuesta al tratamiento también es de gran utilidad para orientar el diagnóstico [Schara *et al.*, 2008]. Ante una ausencia de respuesta a anticolinesterásicos, o un empeoramiento de los síntomas, se sospechará la presencia de mutaciones en *COLQ* [Bestue-Cardiel *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2012], *DOK7* [Burke *et al.*, 2013; Liewluck *et al.*, 2011] o un síndrome de canal lento con mutaciones en *CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRND* o *CHRNE* [Chaouch *et al.*, 2012b; Engel *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1996]. **Figura 4 y Tabla 2.**

La gran mayoría de los SMC tienen un patrón de herencia autosómico recesivo y frecuentemente se presentan como casos esporádicos. Si, por el contrario, hay unos antecedentes familiares que orienten hacia un tipo de herencia autosómico dominante, la sospecha diagnóstica será la de un síndrome de canal lento con mutaciones en *CHRNA1*, *CHRN1*, *CHRND* o *CHRNE* [Chaouch *et al.*, 2012b; Engel *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1996].

El origen étnico de los pacientes puede orientar hacia mutaciones más frecuentes en función del área geográfica [Abicht *et al.*, 2012]. De este modo, son comunes las variantes *RAPSN* c.264C>A [Müller *et al.*, 2004a] y *DOK7* c.1124_1127dupTGCC en población centroeuropea, la variante *CHRNE* c.130insG en población española y portuguesa [Mihaylova *et al.*, 2010], la variante *CHRNE* c.1353insG en población magrebí [Richard *et al.*, 2008] y la variante *CHRNE* c.1327delG en población romaní [Abicht *et al.*, 1999].

1.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de sospecha de los SMC se basa en las manifestaciones clínicas y los estudios neurofisiológicos, así como en la respuesta a los tratamientos “empíricos” empleados. Los estudios genéticos permiten confirmar el diagnóstico e identificar las mutaciones responsables de la enfermedad. En ocasiones se requiere de estudios funcionales para confirmar la patogenicidad de ciertas variantes.

1.6.1 SIGNOS, SÍNTOMAS Y OTROS DATOS DE SOSPECHA DE SMC

Se enumeran las características que más orientan hacia la existencia de un SMC en un paciente.

- Historia de fatigabilidad con una distrucción topográfica que afecta predominantemente a musculatura ocular, bulbar y de cinturas con debut en periodo neonatal o durante los primeros meses de vida. El debut después de la infancia también ha sido ampliamente descrito, pero es menos frecuente.
- Alteración de los estudios neurofisiológicos dirigidos a explorar la transmisión neuromuscular, con presencia de un decremento mayor del 10% en la amplitud del potencial de acción muscular (CMAP) tras estimulación repetitiva a bajas frecuencias (2-3 Hz).
- Respuesta positiva a tratamientos que actúen directa o indirectamente a nivel de la transmisión neuromuscular, generalmente anticolinesterásicos.
- Ausencia de anticuerpos anti receptor de acetilcolina (anti-AChR) y anti tirosin kinasa musculo específica (anti-MuSK) en suero.
- Ausencia de respuesta a tratamiento inmunosupresor.
- Ausencia de alteraciones significativas en la biopsia muscular a pesar de considerable presencia de debilidad muscular.

- Historia familiar con patrón de herencia autosómico recesivo o dominante.

1.6.2 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS EN SMC

PRUEBAS DE LABORATORIO:

- La creatinquinasa (CK) puede ser normal o estar discretamente elevada. Es muy excepcional que aumente por encima de 10 veces con respecto al valor normal [Ohno *et al.*, 2016], excepto en algunos SMC secundarios a defectos de la glicosilación de proteínas, como el producido por mutaciones en *GMPPB* [Montagnese *et al.*, 2017].
- Anticuerpos anti-AChR y anti-MuSK en suero serán negativos.

ESTUDIOS NEUROFISIOLÓGICOS:

- Es recomendable la realización de estudios neurofisiológicos a todos los pacientes con una sospecha de SMC, ya que muchos de ellos presentan un decremento en el potencial de acción (CMAP) mayor del 10% tras estimulación a bajas frecuencias (2-3 Hz).
- En casos excepcionales, la estimulación a 2-3 Hz no produce una respuesta decremental en el CMAP, pero en cambio sí puede aparecer tras 5-10 minutos de estimulación a 10 Hz.
- En caso de que el test de decremento sea normal en músculos proximales y distales, se recomienda valorar la posibilidad de realizarlo en musculatura facial.
- El electromiograma (EMG) de fibra única es un estudio para evaluar de forma específica los defectos en la transmisión neuromuscular. Se puede emplear como

alternativa o asociado a los estudios electrofisiológicos comentados previamente.

Tiene la ventaja de ser muy sensible pero menos específico, ya que pueden detectarse alteraciones en otras entidades, en particular aquellas en las que existe patología de nervio periférico.

- La estimulación de un sólo nervio puede desencadenar un potencial de acción (CMAP) repetitivo (la denominada “doble respuesta ante estímulo nervioso único”) en pacientes con déficit de acetilcolinesterasa (AChE) o SMC de tipo canal lento (**Figura 3**). También puede presentarse en pacientes con sobredosificación de anticolinesterásicos.
- Una elevada proporción de pacientes con SMC presentan un trazado electromiográfico de carácter miógeno.

PRUEBA TERAPÉUTICA CON ANTICOLINESTERÁSICOS:

La respuesta a anticolinesterásicos se puede evaluar tras administración intravenosa de cloruro de edrofonio, un anticolinesterásico de acción rápida y escasa duración. Es más frecuente que se haga con anticolinesterásicos orales, siempre de forma controlada y con reevaluación de los posibles cambios clínicos.

El denominado “test del edrofonio” o “test del Tensilon®” es recomendable que sea llevado a cabo dentro de una Unidad de Cuidados Intensivos y, en caso de no ser así, se aconseja disponer de atropina para contrarrestar los efectos secundarios que pudieran aparecer. Se obtiene el mayor nivel de mejoría clínica a los 30 minutos de la administración intravenosa del fármaco. Es necesario disponer de una variable bien definida cuya variación pueda ser objetivada (ptosis, debilidad de musculatura extraocular, decremento en EMG...) antes y después de la administración del cloruro de

édrofonio. En los pacientes en los que no exista un signo o síntoma evidente que sea fácilmente monitorizable, es preferible realizar una prueba con anticolinesterásicos orales durante unos días y reevaluar posteriormente.

ESTUDIOS ANATOMOPATOLÓGICOS

La biopsia muscular, incluyendo estudios inmunohistoquímicos, habitualmente no muestra alteraciones específicas en los pacientes con SMC. Sí que es frecuente que puedan aparecer cambios menores inespecíficos, como el predominio de fibras tipo I o de contracción lenta o cambios miopáticos menores. La excepción son los SMC producidos por mutaciones en *GFPT1* [Guergueltcheva *et al.*, 2012; Selcen *et al.*, 2013], donde aparecen típicamente agregados tubulares, y los SMC secundarios a mutaciones en *GMPPB* [Montagnese *et al.*, 2017; Rodríguez Cruz *et al.*, 2016], donde aparecen cambios distróficos y reducción de la expresión de alfa distroglicano.

Aunque no es frecuente su detección, pueden existir alteraciones severas a nivel de la placa motora que pueden contribuir a la confirmación diagnóstica.

1.6.3 ESTUDIO GENÉTICO EN PACIENTES CON SOSPECHA CLÍNICA DE SMC.

El estudio genético de estos pacientes en ocasiones supone un desafío diagnóstico. Debe existir un alto índice de sospecha basado en tres pilares fundamentales: la clínica, la historia familiar y los estudios neurofisiológicos, que pueden ayudar a confirmar la presencia de una alteración en la unión neuromuscular.

Ante una sospecha clínica de SMC se recomienda confeccionar un árbol genealógico extenso para poder interpretar el patrón de herencia y conocer la existencia de otros familiares afectados. Posteriormente un estudio de decremento realizado a 2-3 Hz o un estudio de fibra simple pueden confirmar la presencia de defectos a nivel de la transmisión neuromuscular.

Tras la confirmación del diagnóstico clínico de un SMC, es recomendable intentar alcanzar un diagnóstico genético. Debido al rápido desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y a la disminución del coste económico de las mismas, hoy en día se recomienda hacer el estudio genético mediante paneles o exoma clínico dirigido hacia genes asociados con SMC. En cualquier caso, no deja de ser cierto que la presencia de determinados signos guía puede orientar al clínico con experiencia hacia el gen donde se localiza el defecto. Algunos de estos signos guía ya han sido descritos en el apartado de *Clinica*. Si la sospecha de un subtipo de SMC en concreto es muy alta, es recomendable iniciar el estudio genético con la secuenciación del gen donde se presupone que se localizan las mutaciones. Por otra parte, es necesario tener presente la prevalencia de los distintos subtipos de SMC en el grupo étnico del paciente, siendo más probable que la alteración genética se localice en algunos de los genes más frecuentemente alterados.

1.7 TRATAMIENTO

El tratamiento de las miastenias congénitas es sintomático. El objetivo, en todos los casos, será mejorar la transmisión neuromuscular y, por ende, disminuir el síntoma principal, la fatigabilidad. El abordaje terapéutico de los diversos subtipos de SMC es

diferente dependiendo del mecanismo fisiopatológico responsable del defecto a nivel de la unión neuromuscular. Es recomendable alcanzar un diagnóstico genético o, al menos, una orientación antes de la instauración de un tratamiento: determinados fármacos pueden producir un gran beneficio clínico en ciertos subtipos de SMC y un gran empeoramiento en otros.

En ocasiones no se dispone de una orientación diagnóstica hacia ningún defecto genético concreto ni se dispone de resultados genéticos. Cuando se dan estas circunstancias y la sintomatología clínica es incapacitante, debe ser valorada la posibilidad de iniciar tratamiento empírico con alguno de los fármacos habitualmente usados en SMC. En estos casos es aconsejable un seguimiento estrecho del paciente con reevaluaciones frecuentes por el riesgo de empeoramiento que pueden tener algunos pacientes con determinados fármacos. En la **figura 4** se muestra un esquema de abordaje terapéutico para pacientes sin diagnóstico genético en los que se va a iniciar tratamiento farmacológico.

En pacientes con diagnóstico genético se seguirán las recomendaciones terapéuticas específicas para el subtipo de SMC que padece el paciente. En la **tabla 2** se exponen las recomendaciones de tratamiento para algunos de los subtipos de SMC más prevalentes.

En términos generales, los tres grupos de fármacos más utilizados en el tratamiento de las miastenias congénitas son los siguientes [Abicht *et al.*, 2003; Engel *et al.*, 2012a; Engel *et al.*, 2015; Schara *et al.*, 2008]:

- Agonistas colinérgicos: Inhibidores de la acetilcolinesterasa (piridostigmina) y 3-4 diaminopiridina (3-4 DAP).
- Modificadores de la cinética del receptor de acetilcolina que actúan reduciendo su tiempo de apertura: Fluoxetina y quinidina.
- Agonistas adrenérgicos: Efedrina y salbutamol.

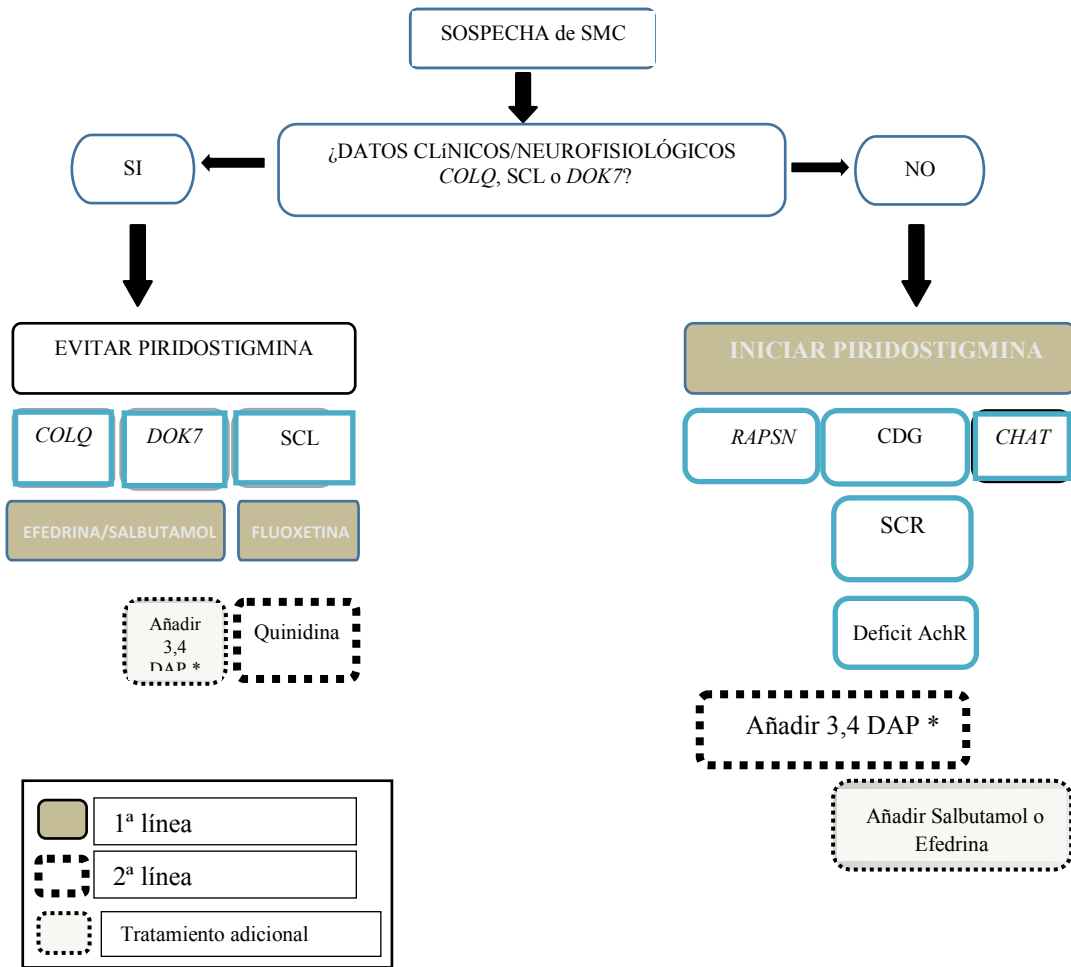


Figura 4. Estrategia de tratamiento recomendada por Beeson *et al.*, 2014 ante una sospecha de SMC. Se debe evitar el tratamiento con piridostigmina ante sospecha clínica de SMC por *DOK7*, *COLQ* o síndrome de canal lento (SCL). El tratamiento combinado con piridostigmina y salbutamol o efedrina puede probarse en SMC por déficit de receptor de acetilcolina, por defectos de la glicosilación de proteínas y en síndromes con canal rápido. La 3,4-DAP puede asociarse con precaución (asterisco) en pacientes con SMC por *DOK7*, *RAPSN*, defectos de la glicosilación (CDG), déficit de receptor de acetilcolina y síndrome de canal rápido. En pacientes con síndrome de canal lento se puede emplear quinidina como alternativa a la fluoxetina.

INTRODUCCIÓN

SMC	Tratamiento Recomendado	Precauciones
CHAT	Piridostigmina 4-5 mg/kg/día en 4-6 dosis diarias. Se puede asociar 3,4-DAP 1 mg/kg/día en 4 dosis diarias (Máx 20 mg/día)	
COLQ	Efedrina 3 mg/kg/día en 3 dosis diarias (Inicio a 1 mg/kg/día). o Salbutamol	Evitar Piridostigmina
CHRNA1 CHRNB1 CHRNA1 CHRNA1	Piridostigmina 4-5 mg/kg/día en 4-6 dosis diarias. Se puede asociar 3,4-DAP 1 mg/kg/día en 4 dosis diarias (Máx 20 mg/día) Se puede asociar salbutamol	
Síndrome canal lento (SCL)	Sulfato de quinidina 15-60 mg/kg/día en 4-6 dosis diarias ó Fluoxetina (en adultos 80-100 mg/día)	Evitar Piridostigmina
Síndrome canal rápido (SCR)	Piridostigmina 4-5 mg/kg/día en 4-6 dosis diarias. Se puede asociar 3,4-DAP 1 mg/kg/día en 4 dosis diarias (Máx 20 mg/día)	Evitar fluoxetina y quinidina
RAPSN	Piridostigmina 4-5 mg/kg/día en 4-6 dosis diarias. Se puede asociar 3,4-DAP 1 mg/kg/día en 4 dosis diarias (Máx 20 mg/día)	
DOK7	Efedrina 3 mg/kg/día en 3 dosis diarias (Inicio a 1 mg/kg/día). ó Salbutamol. Se puede asociar 3,4-DAP 1 mg/kg/día en 4 dosis diarias (Máx 20 mg/día)	Evitar Piridostigmina
GFPT1 DPAGT1 ALG2/ALG14 GMPPB	Piridostigmina 4-5 mg/kg/día en 4-6 dosis diarias.	

Tabla 2. Tratamiento farmacológico recomendado en algunos de los subtipos de SMC más prevalentes (Modificado de Schara *et al.*, 2012)

1.7.1 ABORDAJE TERAPÉUTICO DE LOS SMC PRESINÁPTICOS:

La formación y liberación de acetilcolina se produce principalmente en el terminal axonal presináptico. Los distintos mecanismos que originan este subtipo de miastenia dan lugar a una disminución de la acetilcolina en la hendidura sináptica. Por tanto, el objetivo del tratamiento es aumentar la respuesta a la acetilcolina en la sinapsis. Dos fármacos pueden mejorar esta respuesta: 1) Los anticolinesterásicos, que aumentan la respuesta sináptica a la acetilcolina, y 2) la 3-4 DAP, que aumenta la liberación de la acetilcolina [Engel, 2007] (**Tabla 2**).

La acetilcolinesterasa hidroliza a la acetilcolina después de que esta se haya unido a sus receptores. Los anticolinesterásicos inhiben a la acetilcolinesterasa, de modo que se acumula acetilcolina en la proximidad de las terminaciones nerviosas colinérgicas, aumentando el número de receptores de acetilcolina activados por cada cuanta liberada. La respuesta clínica es mayor a nivel de la fatigabilidad y la debilidad de la musculatura cervical y de extremidades, así como sobre la sintomatología bulbar. Sin embargo, los síntomas oculares (diplopía, ptosis) pueden no mejorar. La dosis recomendada en población pediátrica es 4-5 mg/kg en 4-6 tomas al día y en adultos de 30 a 60 mg cada 6-8 horas [Schara et al., 2012]. En el SMC por mutaciones en *CHAT* el tratamiento con anticolinesterásicos disminuye la frecuencia de crisis de apnea [Schara et al., 2010].

La 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) es un bloqueante de los canales de potasio. Su mecanismo de acción consiste en prolongar la duración del potencial de acción presináptico (al bloquear la corriente externa de potasio), aumentando la entrada de

calcio en el terminal axonal presináptico cuando éste es despolarizado, produciéndose un aumento en la liberación de cuantas de acetilcolina [Ng *et al.*, 2016]. La dosis recomendada es de 5-20 mg en 3-4 dosis diarias, con una dosis media diaria total en adultos de unos 20 mg/día cada 6-8 horas, y 1mg/Kg/día en 4 tomas en niños [Schara *et al.*, 2012]. El beneficio de su administración se observa a los 20 minutos de la toma oral y persiste durante algo más de 4 horas con una respuesta máxima en 3 o 4 días por su efecto acumulativo. Se observa mejoría especialmente en la resistencia muscular y en la ptosis palpebral [de la Vaissière *et al.*, 2015; Schara *et al.*, 2012].

1.7.2 ABORDAJE TERAPÉUTICO DE LOS SMC SINÁPTICOS:

Desde el punto de vista terapéutico, este grupo de SMC constituye una excepción dentro del abordaje general de los SMC. En este grupo existe un exceso de acetilcolina en el espacio sináptico, como consecuencia de una alteración en la función de la acetilcolinesterasa o por una ausencia de la misma. La sobreexposición del receptor de acetilcolina a la acetilcolina de forma prolongada acarrea una desensibilización del receptor de acetilcolina y un bloqueo en la despolarización en índices fisiológicos de estimulación. Esto secundariamente provoca una miopatía de placa motora con pérdida de receptores de acetilcolina, debido a la sobrecarga iónica en la región postsináptica. En este grupo de SMC deben evitarse los anticolinesterásicos, ya que provocan un aumento aún mayor de acetilcolina en la sinapsis, con un empeoramiento clínico asociado.

Aunque no existe un tratamiento efectivo en la actualidad, los agonistas adrenérgicos, especialmente la efedrina [Bestue-Cardiel *et al.*, 2005] y el salbutamol [Burke *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2012; Liewluck *et al.*, 2011], han mostrado beneficios

sintomáticos en las miastenias sinápticas. El mecanismo por el que la efedrina y el salbutamol mejoran la transmisión neuromuscular no es del todo conocido, pero se hipotetiza que interviene a nivel del complejo AGRN-LRP4-MUSK-DOK7, ofreciendo un mecanismo compensatorio para estabilizar las estructuras de la membrana postsináptica [Rodríguez Cruz *et al.*, 2015]. Parece que, además, tanto uno como otro actúan como bloqueantes de vida media corta del canal abierto del receptor de acetilcolina. Este efecto podría disminuir la respuesta sináptica incrementada a la acetilcolina que existe en el déficit de acetilcolinesterasa. El tratamiento con salbutamol produce un aumento de fuerza muscular y resistencia, con escasa mejoría a nivel de musculatura extraocular [Chan *et al.*, 2012; Liewluck *et al.*, 2011]. La dosis recomendada de efedrina en niños es de 2-3 mg/kg/día, y en adultos entre 50-200 mg/día en dos o tres dosis. La dosis de salbutamol recomendada en niños de 2- 6 años es 0,1 mg/kg/día (máximo 2 mg) 3 veces al día. En niños de 6-12 años se recomienda emplear 2-3 dosis de 2 mg diarias. En adultos se recomienda administrar 2-3 dosis de 4 mg. Los efectos secundarios de ambos fármacos son debidos, como en cualquier amina, a los efectos adrenérgicos: taquicardia, nerviosismo, HTA, temblor, ansiedad... Se desaconseja su uso en ancianos, hipertensos y/o pacientes con cardiopatía isquémica. Con salbutamol casi la mitad de los pacientes presentan calambres musculares que disminuyen con el descenso de dosis.

1.7.3 ABORDAJE TERAPÉUTICO DE LOS SMC POSTSINÁPTICOS:

De forma general, el tratamiento de elección en la mayoría de los SMC postsinápticos son los anticolinesterásicos. El efecto beneficioso de la piridostigmina puede aumentar con la asociación de 3,4-DAP [Kinali *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2016; Palace, 2012]. Como en otros SMC, la respuesta al tratamiento con piridostigmina es

menor a nivel ocular (ptosis, oftalmoplejía) y mayor a nivel de fatigabilidad y debilidad. Las principales excepciones a la buena respuesta de los SMC postsinápticos a los anticolinesterásicos son los SMC producidos por mutaciones en *DOK7* [Ben Ammar *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2013] y el síndrome de canal lento (SCL) [Chaouch *et al.*, 2012b]. Tampoco mejoran con piridostigmina otros SMC mucho menos prevalentes como los producidos por mutaciones en *PLEC1*, *MUSK*, *LRP4*, *COL13A1*. En estos tres últimos existe buena respuesta al tratamiento con salbutamol y efedrina [Forrest *et al.*, 2010; Logan *et al.*, 2016; Maggi *et al.*, 2013; Selcen *et al.*, 2015].

En el SMC por déficit de receptor de acetilcolina se ha descrito efecto beneficioso tras asociar salbutamol a piridostigmina en pacientes con uso prolongado de inhibidores de acetilcolina [Rodríguez Cruz *et al.*, 2015]. El uso prolongado de anticolinesterásicos puede afectar a la neurotransmisión y a la estructura de la placa motora y se considera que los β -2 adrenérgicos podrían ayudar a contrarrestar este efecto en la neurotransmisión y, por tanto, se deben tener en cuenta como opción terapéutica si la respuesta a anticolinesterásicos disminuye con el tiempo.

El tratamiento de elección en el síndrome de canal lento es fluoxetina a una dosis de 80-120 mg/día en adultos [Chaouch *et al.*, 2012b, Colomer *et al.*, 2006]. En este síndrome, el tiempo de apertura del canal iónico está prolongado y la fluoxetina actúa disminuyendo el tiempo de apertura del mismo al modificar su cinética. Los efectos secundarios más frecuentemente asociados a fluoxetina son las náuseas, insomnio, inquietud, hiponatremia, hipotensión, e impotencia. El potencial efecto adverso más grave es la crisis serotoninérgica. Se debe introducir la fluoxetina con precaución en niños y adolescentes con riesgo o antecedentes de ideación o tentativas

suicidas. Un segundo fármaco que también puede emplearse en estos pacientes es la quinidina, mucho menos utilizado por sus efectos secundarios. Al inhibir el citocromo P450, interfiere en el metabolismo de gran cantidad de fármacos de uso frecuente: codeína, antidepresivos tricíclicos, digoxina, antiarrítmicos... Además, disminuye la velocidad de conducción aurículo-ventricular y potencia los efectos de los anticoagulantes. Las dosis recomendadas de quinidina son 15-60 mg/Kg/día en niños en 4 a 6 tomas y en adultos 200 mg cada 8 horas. En el síndrome de canal lento no deben emplearse los anticolinesterásicos ya que producirán un empeoramiento clínico al incrementar la cantidad de acetilcolina en la sinapsis que condiciona una sobrecarga catiónica en el terminal postsináptico.

En el SMC causado por defectos en *DOK7*, los anticolinesterásicos producen una mejoría limitada en el tiempo en menos del 10% de los casos; habitualmente ese efecto beneficioso desaparece a las pocas semanas. En el 40% de los casos producen un empeoramiento clínico, aunque no tan evidente como en el síndrome de canal lento [Ben Ammar *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2013; Witting *et al.*, 2014]. Por ello, la piridostigmina debe ser evitada, siendo los tratamientos de elección salbutamol y efedrina, en combinación con 3,4-DAP si fuera necesario. La dosis de efedrina a emplear en adultos es de 25-50 mg cada 8-12 horas y en niños hasta de 3 mg/kg/día a administrar en 3 dosis diarias (se recomienda iniciar el tratamiento a 0,5-1 mg/kg/día en 3 dosis diarias). Los efectos secundarios más frecuentes son hipertensión, nerviosismo, palpitaciones e insomnio. La dosis de salbutamol será de 0,1-0,3 mg/kg/día en niños menores de 6 años (máximo 2 mg) 3 veces al día, 2 mg 3 veces al día en niños entre 6 y 12 años, y de 4-16 mg/día en adultos, en una a tres dosis diarias [Schara *et al.*, 2012]. Los efectos secundarios referidos con mayor frecuencia son temblor, palpitaciones y

cefalea. El inicio del efecto del tratamiento empieza a los dos días y su efecto máximo suele alcanzarse a las 2-4 semanas de iniciado el tratamiento. El principal efecto del salbutamol es un incremento en la tolerancia al esfuerzo [Rodríguez Cruz *et al.*, 2015]. En líneas generales, la efedrina es peor tolerada que el salbutamol en niños. Es habitual que para tratar el SMC por *DOK7* se emplee efedrina como primera opción en adultos y salbutamol en niños.

1.8 SMC POR DEFECTOS CONGÉNITOS DE LA GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

El proceso de N-glicosilación de proteínas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y consiste en la unión de un oligosacárido precursor compuesto por tres glucosas, nueve manosas y dos N-acetilglucosaminas al extremo amino terminal de un residuo de asparragina. Este precursor es modificado posteriormente mediante la acción de glicosidasas y glicosiltransferasas (**Figura 5**). Hasta el momento se ha descrito la presencia de un SMC en relación con defectos en cinco de las enzimas que participan en el proceso de glicosilación de proteínas (GFPT1, DPAGT1, ALG2, ALG14 y GMPPB). Dado que la localización de proteínas glicosiladas en el organismo es ubicua, la clínica presentada por los pacientes con este tipo de SMC puede no limitarse únicamente a los signos derivados de la afectación de la unión neuromuscular, pudiendo presentar también clínica neurológica de otro tipo.

Dentro de la placa motora existen proteínas glicosiladas localizadas tanto a nivel presináptico como postsináptico. En cualquier caso, la sintomatología derivada de la afectación postsináptica es la más evidente: se ha planteado la hipótesis de que exista una particular sensibilidad a los defectos de la N-glicosilación de proteínas durante el proceso de formación de los receptores de acetilcolina.

GFPT1

El gen *GFPT1* codifica la proteína glutamina-fructosa-6-fosfatotransaminasa-1, que cataliza el primer paso de la biosíntesis de N-acetilglucosamina. Los pacientes con SMC causado por mutaciones en este gen presentan una clínica de debilidad de cinturas, con fatigabilidad y agregados tubulares en la biopsia muscular [Belaya *et al.*, 2012]. La musculatura facial y ocular se encuentra preservada y no presentan afectación de la musculatura bulbar ni respiratoria. La creatinquinasa puede estar discretamente elevada y en la electromiografía pueden encontrarse alteraciones compatibles con un cuadro miopático. Generalmente presentan una leve progresión de su debilidad de cinturas con el tiempo. Existe una respuesta positiva a anticolinesterásicos [Guerguelcheva *et al.*, 2012; Selcen *et al.*, 2013].

Los mecanismos fisiopatológicos de este SMC todavía no se conocen del todo. Muchas de las proteínas que intervienen en la unión neuromuscular están glicosiladas y es difícil esclarecer cual es el resultado global de un defecto de la glicosilación que teóricamente afecta a todas. La hipótesis más aceptada es que existe una disminución del número de receptores de acetilcolina en la membrana postsináptica.

DPAGTI

El gen *DPAGTI* codifica la proteína fosfotransferasa N-acetilglucosamina dolicol-fosfato, que también está implicada en la N-glicosilación. Clínicamente, este cuadro es muy similar al producido por mutaciones en *GFPT1*, con un fenotipo de cinturas y respeto de la musculatura facial, ocular, bulbar y respiratoria, presentando buena respuesta a anticolinesterásicos. La debilidad, con fatigabilidad asociada, afecta predominantemente a los músculos proximales, pero también a la musculatura distal.

Algunos de los pacientes presentan escoliosis. El rango de edad para el debut va desde los 6 meses hasta la adolescencia. En la biopsia muscular es frecuente encontrar hallazgos compatibles con miopatía y en la mayoría de los casos se encuentran agregados tubulares, aunque no siempre. Pueden encontrarse niveles de elevados de CK, al igual que en *GFPT1* y en *GMPPB*. Al igual que en el SMC por *DOK7*, se han descrito casos de pacientes con fluctuaciones en el curso de la enfermedad y calambres musculares pero, a diferencia de éste, hay buena respuesta a anticolinesterásicos. Es frecuente encontrar alteraciones cognitivas que van desde un trastorno del aprendizaje a un trastorno del espectro autista [Belaya *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2015].

ALG2 y ALG14

Como en el resto de SMC por defectos en la glicosilación, el fenotipo clínico se caracteriza por la presencia de debilidad de cinturas sin afectación ocular, facial, ni bulbar y con buena respuesta a piridostigmina. En los SMC por mutaciones en *ALG14* se ha descrito estrabismo. La biopsia muestra cambios inespecíficos y no se observan agregados tubulares. En el SMC por *ALG2* el curso clínico parece lentamente progresivo desde la infancia temprana, con un retraso en el desarrollo motor e hipotonía. Algunos pacientes no llegan a adquirir la capacidad de deambulación. Por todo ello, puede confundirse con una distrofia congénita. Este grupo tiene moderada debilidad facial a diferencia del resto de trastornos de la glicosilación y pueden desarrollar insuficiencia respiratoria moderada. Los niveles de CK son normales y se ha descrito la presencia de agregados tubulares en algunos pacientes [Cossins *et al.*, 2013].

GMPPB

Los pacientes con SMC por afectación de *GMPPB* presentan debilidad proximal de aparición precoz, una elevación de CK y discapacidad intelectual, pudiendo confundirse con una distrofia muscular congénita. En muchos pacientes no se objetiva la presencia de síntomas típicamente miasteniformes como ptosis, oftalmoplejia o debilidad facial. En la biopsia muscular se observan alteraciones distróficas y en algunos pacientes se ha objetivado una reducción de alfa-distroglicano mediante técnicas inmunohistoquímicas [Belaya *et al.*, 2015; Carrs *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2015; Rodríguez Cruz *et al.*, 2016].

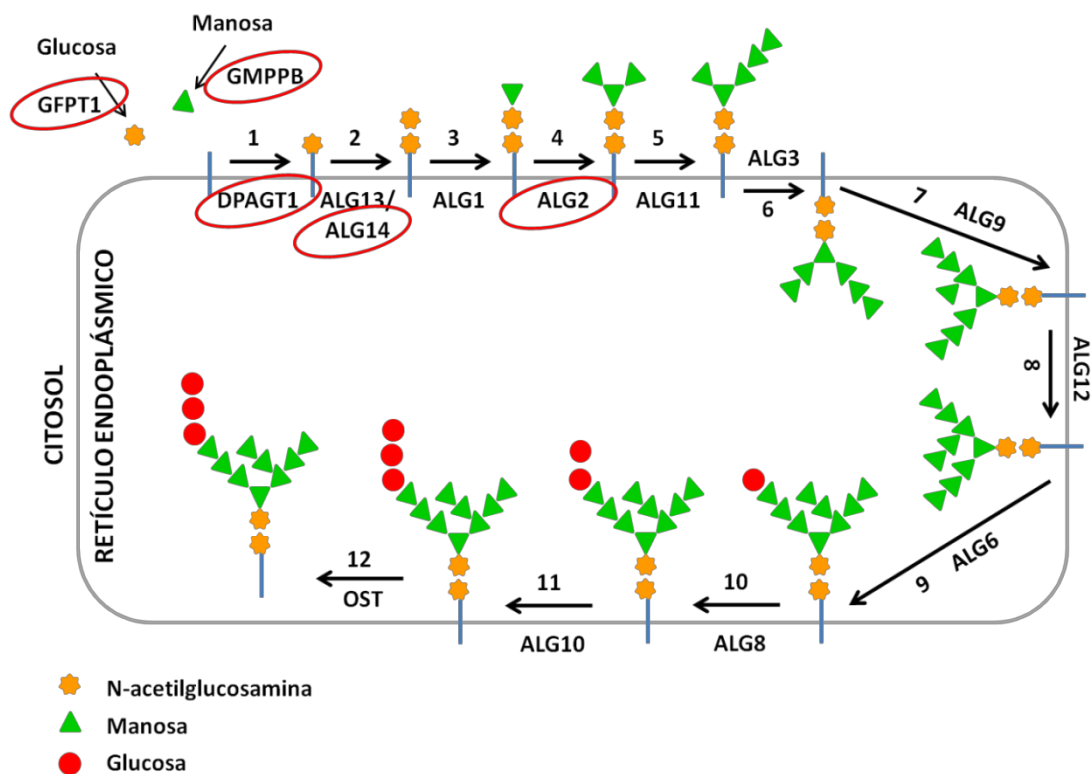


Figura 5. Representación esquemática de la ruta de la N-glicosilación. Rodeadas por un óvalo rojo, se encuentran las 5 enzimas en las que se ha encontrado una mutación que provoca un SMC: GFPT1 (glutamina-fructosa-6-fosfatotransaminasa-1), DPAGT1 (fosfotransferasa-1 N-acetilglucosamina dolicolfosfato), ALG2 (alfa 1,3 manosiltransferasa), ALG14 (defecto en ALG14 que forma junto con ALG13 y DPAGT1 el complejo multiglicosiltransferasa), GMPPB (manosa 1-fosfato guaniltransferasa beta).

1.9 MIOPATÍAS CONGÉNITAS CON ALTERACIONES SECUNDARIAS A NIVEL DE LA UNIÓN NEUROMUSCULAR

En los últimos años se han descrito casos de un creciente número de pacientes con miopatía congénita confirmada genéticamente y presencia de alteraciones en la unión neuromuscular, con buena respuesta a anticolinesterásicos [Rodríguez Cruz *et al.*, 2014b; Robb *et al.*, 2011]. Se ha objetivado clínica miasteniforme en miopatías centronucleares causadas por mutaciones en anfifisina (*BINI*) [Claeys *et al.*, 2010] y en dinamina 2 (*DNM2*) [Gibbs *et al.*, 2010], miopatías miotubulares ligadas al X por mutaciones en miotubularina (*MTM1*) [Robb *et al.*, 2011], miopatías congénitas por desproporción del tipo de fibras por mutaciones en *TPM3* [Munot *et al.*, 2010] y *RYR1* [Illingworth *et al.*, 2014] y miopatías por mutaciones en *TPM2* [Rodríguez Cruz *et al.*, 2014b].

En todos estos casos se ha demostrado la existencia de una alteración a nivel de la placa motora y una respuesta positiva al tratamiento con anticolinesterásicos. Por ello, las miopatías congénitas deben ser incluidas dentro del diagnóstico diferencial en aquellos pacientes que cursan con fatigabilidad, buena respuesta a piridostigmina o hallazgos neurofisiológicos típicas de alteraciones en la unión neuromuscular. Por otro lado, es recomendable valorar la posibilidad de realizar una prueba terapéutica con piridostigmina o salbutamol en pacientes con diagnóstico de miopatía congénita en el caso de que exista fatigabilidad asociada [Rodríguez Cruz *et al.*, 2014b].

II JUSTIFICACIÓN

Los síndromes miasténicos congénitos (SMC) constituyen un grupo de trastornos neuromusculares clínica y genéticamente heterogéneo. En los últimos años hemos asistido a un gran avance en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que impiden el correcto funcionamiento de la unión neuromuscular. La caracterización de la clínica, la patogénesis y el tratamiento de cada uno de los subtipos de SMC es esencial para profundizar en el conocimiento de estos trastornos y tratar eficazmente a los pacientes que presentan esta patología.

En la última década se han incrementado de manera exponencial las investigaciones en torno a los SMC. El desarrollo tecnológico ha permitido que las técnicas empleadas en genética molecular sean cada vez más avanzadas y que el coste de los estudios genéticos se haya reducido. Gracias a ello se han descrito hasta el momento 28 genes implicados en el correcto funcionamiento de la unión neuromuscular. Cada vez más pacientes son diagnosticados genéticamente, permitiendo alcanzar cohortes de pacientes más numerosas y, de este modo, poder definir el fenotipo con una mayor precisión. A pesar de ello, son necesarios más estudios para poder identificar con mayor exactitud las características propias de cada tipo de SMC.

El conocimiento preciso de las características clínicas, genéticas, fisiopatológicas y epidemiológicas es fundamental en estas enfermedades ya que, a diferencia de otras enfermedades neuromusculares, los SMC son tratables. La respuesta al tratamiento es heterogénea. Además, el tratamiento óptimo varía en función del tipo

de SMC, con la relevancia que ello tiene para el enfermo y para el clínico que debe seleccionar y ofrecer el tratamiento más adecuado para el paciente. Tratar de avanzar en este conocimiento es uno de los motivos centrales que justifica esta tesis doctoral y que nos lleva a plantear diversos objetivos en torno a esta cuestión.

Hasta el momento no se había llevado a cabo un estudio epidemiológico para caracterizar los SMC en nuestro país. Con esta tesis hemos intentado conocer cuáles son las alteraciones genéticas más frecuentes en nuestro medio y definir con la mayor precisión posible cuáles son las características clínicas y la respuesta terapéutica de cada uno de los subtipos de SMC. Los SMC más prevalentes en nuestro medio han sido definidos con un mayor detalle, ya que estas cohortes más numerosas permiten extraer conclusiones más fiables.

III OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta investigación es describir las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con diagnóstico genético de síndrome miasténico congénito en España.

A continuación se detallan los **objetivos específicos**:

1. Describir la prevalencia de los SMC en España y caracterizar molecularmente los diversos subtipos de SMC.
2. Determinar la correlación entre las alteraciones genéticas responsables del SMC y el fenotipo clínico, neurofisiológico y anatomopatológico.
3. Determinar la correlación entre la respuesta a los diversos tratamientos farmacológicos y el defecto genético identificado.
4. Describir las características clínicas, genéticas, neurofisiológicas y de respuesta al tratamiento en pacientes con SMC causado por mutaciones en *RAPSN*.
5. Describir la variabilidad fenotípica en una cohorte de pacientes con SMC causado por una misma mutación: *CHRNE* c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64).
6. Describir clínicamente los casos de pacientes con miopatía congénita y una afectación secundaria de la unión neuromuscular, en los que el tratamiento con anticolinesterásicos da lugar a una respuesta clínica franca.

- El objetivo general es abordado en el estudio 1 (pendiente de aceptación para su publicación) y en los estudios 2, 3 y 4 (publicaciones originales 1, 2 y 3 en Anexos 1-3).
- Los objetivos específicos 1, 2 y 3 son abordados en el estudio 1 (pendiente de aceptación para su publicación) y en los estudios 2 y 3 (publicaciones originales 1 y 2 en Anexos 1 y 2).
- El objetivo específico 4 es abordado en el estudio 2 (publicación original número 1 en Anexo 1).
- El objetivo específico 5 es abordado en el estudio 3 (publicación original número 2 en Anexo 2).
- El objetivo específico 6 es abordado en el estudio 4 (publicación original número 3 en Anexo 3).

IV MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los hospitales españoles con consulta de neurología infantil y la mayoría de hospitales de tercer nivel con consulta de neurología de adultos fueron invitados a participar en este estudio. Participaron la mayoría de unidades de referencia nacional para el manejo de enfermedades neuromusculares. Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico genético de SMC de los servicios de Neurología y Neurología Infantil de los siguientes centros hospitalarios: Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona), Hospital La Fe (Valencia), Hospital Marqués de Valdecilla (Santander), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), Hospital San Jorge (Huesca), Hospital de Cruces (Bilbao), Hospital de Bellvitge (Barcelona), Hospital 12 de Octubre (Madrid), Hospital Rey Juan Carlos (Madrid), Hospital Gregorio Marañón (Madrid), Hospital Materno-Infantil (Las Palmas de Gran Canaria). El estudio cumple con los criterios éticos de las instituciones participantes. Se obtuvo el consentimiento por parte de los pacientes o sus tutores, en el caso de los menores de edad, para publicar cualquier información por la que pudieran ser reconocidos los pacientes.

Los pacientes fueron reevaluados mediante una exploración física detallada en los doce meses previos a la redacción de esta tesis doctoral. Se empleó la escala del Medical Research Council (MRC) para medir la fuerza de los pacientes. Para medir la fatigabilidad en los diferentes grupos musculares se empleó la escala QMG (quantitative myasthenia gravis). Se recogieron los datos relativos a los estudios neurofisiológicos y anatomopatológicos realizados en cada paciente.

Los datos relativos a algunos pacientes con mutaciones en *GFPT1* (pacientes 38-44) y *DOK7* (pacientes 46-49) habían sido previamente publicados por Guergueltcheva *et al.* [Guergueltcheva *et al.*, 2012] y Müller *et al.* [Müller *et al.*, 2007], respectivamente. Cinco pacientes con mutaciones en *COLQ* (pacientes 29-34) y dos casos con SMC con síndrome de canal lento (pacientes 26, 27) habían sido descritos, respectivamente, por Mihaylova *et al.* [Mihaylova *et al.*, 2008] y Chaouch *et al.* [Chaouch *et al.*, 2012]. El resto de pacientes no habían sido publicados previamente.

En los 64 pacientes se realizó estudio genético y, cuando fue posible, también en sus progenitores. El ADN genómico se aisló a partir de muestras de sangre venosa utilizando un kit de extracción de ADN de sangre de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Promega, Mannheim, Alemania).

Las regiones codificantes completas de los genes relacionados con SMC se amplificaron y secuenciaron mediante secuenciación Sanger bidireccional o next generation sequencing (NGS) por los respectivos laboratorios. Se emplearon diversas metodologías NGS para preparar y capturar las librerías de ADN, desde paneles diseñados específicamente para un grupo de genes concretos a secuenciación de exoma completo. En todos los casos la secuenciación se llevó a cabo con tecnología Illumina y se aplicaron herramientas bioinformáticas para control de calidad, limpieza, mapeo, recalibración y anotación. Se emplearon bases de datos públicas (HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>; LOVD: <http://www.dmd.nl/>; ExAC: <http://exac.broadinstitute.org/> y EVS: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) para identificar las variantes informadas previamente y también para determinar la frecuencia de las nuevas variantes observadas. Para las variantes missense se emplearon

varias herramientas de estudio *in silico* (Polyphen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/ggi/ggi2.cgi>; UMD-Predictor: <http://umd-predictor.eu/analysis.php> y Mutation taster: <http://www.mutationtaster.org/>) para pronosticar la patogenicidad de estas variantes.

Los materiales y métodos empleados para llevar a cabo los estudios 2, 3 y 4 se detallan en el texto de los tres artículos publicados. Todos ellos fueron publicados en revistas indexadas y pertenecientes al área de conocimiento de Neurología Clínica. Para conocer los materiales y métodos empleados en estos estudios, se remite al lector a los anexos 1, 2 y 3, donde se incluyen los mencionados artículos.

V RESULTADOS

V.1 ESTUDIO 1: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN ESPAÑA.

En este trabajo, pendiente de próxima publicación, se recogieron datos de una cohorte de 64 pacientes (24 varones y 40 mujeres) de 47 familias diferentes. Todos ellos tenían diagnóstico genético de SMC. La edad media de los pacientes fue de 27 años, con un rango de edad de 0,5 a 80 años. La prevalencia de SMC con diagnóstico genético en las regiones españolas analizadas es, de acuerdo con nuestros datos, de 1,8 casos por millón de habitantes. Esta prevalencia es variable en las distintas comunidades autónomas. La Comunidad Valenciana tuvo la prevalencia más alta, con 3,2 casos por millón de habitantes. Clasificados por subtipos, el SMC por mutaciones en *CHRNE* es el más frecuente, representando un 26,6% del total de casos, seguido de *RAPSN* (17,2%), *COLQ* (14,1%), *GFPT1* (12,5%), *DOK7* (10,9%), *CHRNG* (7,8%), *GMPPB* (4,7%), *CHAT* (3,1%), *CHRNA1* (1,6%) y *CHRNBI* (1,6%). La **Tabla 3** muestra el número de pacientes con cada subtipo de SMC.

Siete de las 47 familias eran consanguíneas (14,9%) y 25 de los 64 pacientes (39,1%) tenían al menos un familiar afecto. El origen étnico de la mayoría de los pacientes fue español caucásico (44/64; 71,9%), seguido de españoles romaníes (9/64; 14,1%). Tres de los casos son de origen magrebí (pacientes 26, 55 y 56), tres egipcios (pacientes 58-60), dos subsaharianos (pacientes 39 y 63) y una ecuatoriana (paciente 54). Ver **Tablas 4 y 5**.

Gen alterado	Número de pacientes	Prevalencia por millón de habitantes
<i>CHRNE</i>	17	0.47
<i>RAPSN</i>	11	0.31
<i>COLQ</i>	9	0.25
<i>GFPT1</i>	8	0.22
<i>DOK7</i>	7	0.19
<i>CHRNG</i>	5	0.14
<i>GMPPB</i>	3	0.08
<i>CHAT</i>	2	0.06
<i>CHRNA1</i>	1	0.03
<i>CHRNBI</i>	1	0.03

Tabla 3. Número de pacientes con cada subtipo de SMC en nuestra cohorte y prevalencia en la población estudiada.

V.1.1 RESULTADOS GENÉTICOS DE LOS SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN ESPAÑA.

Fueron identificadas 36 mutaciones diferentes en estos pacientes, localizadas en los genes *CHRNE*, *RAPSN*, *COLQ*, *GFPT1*, *DOK7*, *CHRNG*, *GMPPB*, *CHAT*, *CHRNA1* y *CHRNBI*, seis de ellas no habían sido previamente publicadas. Las mutaciones encontradas se resumen en la **Tabla 4**. De entre están seis mutaciones, cuatro fueron missense, una delección in-frame y una nueva variante de splicing.

Las nuevas mutaciones *CHRNE* c.1373_1375delGCT (p.Cys478del) y *GFPT1* c.686-2A>G (IVS8-2A>G) fueron detectadas en homocigosis en los pacientes 26 y 45, respectivamente. Las mutaciones *DOK7* c54+12_54+23del, *CHAT* c.1231G>A (p.Gly411Arg), *CHAT* c.1300G>A (p.Gly434Ser) y *CHAT* c.1505T>C; (p.Leu502Pro) fueron detectadas en heterocigosis, junto a una segunda mutación, en los pacientes 51, 61 y 62. Ninguna de estas mutaciones había sido recogida a fecha de marzo 2017 en

ninguna de las bases de datos clínicas disponibles (HGMD y LOVD) y no se encuentran dentro de aquellas variantes encontradas en una población control de más de 60.000 individuos (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org/>). Todas estas nuevas variantes fueron interpretadas como “patogénicas” o “probablemente patogénicas” por tres programas de predicción *in silico* diferentes.

Todos los pacientes con mutaciones en *RAPSN* eran portadores de la conocida mutación c.264C>A (p.Asn88Lys) [Müller *et al.*, 2004a; Ohno *et al.*, 2004] en al menos uno de los alelos y tres de ellos la portaban en homocigosis. Además, se encontraron otras cinco mutaciones en *RAPSN* en nuestra serie: c.1185delG (p.Thr396Pfs*12), c.358delC (p.Gln120Serfs*8), c.280G>A (p.Glu94Lys), c.493G>A (p.Val165Met) y c.869T>C (p.Leu290Pro).

La mutación fundadora *CHRNE* c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64), endémica en familias romaníes [Abicht *et al.*, 1999], fue detectada en dos grandes familias gitanas (pacientes 17-25). También fueron detectadas otras mutaciones en *CHRNE* previamente descritas: *CHRNE* c.1353insG (p.Asn542Glufs*4) encontrada en cuatro pacientes de cuatro familias diferentes, *CHRNE* c.130insG (p.Glu44Glyfs*3) detectada en homocigosis en un paciente y en heterocigosis en otros dos pacientes, y *CHRNE* c.865C>T (p.Leu289Phe), encontrada en heterocigosis en dos pacientes.

La mutación *COLQ* c.1289A>C (p.Tyr430Ser) fue detectada en homocigosis en seis pacientes de seis familias diferentes. Además, también estaba presente en heterocigosis en los pacientes 29 y 37 junto a las mutaciones c.1195+1G>A

(IVS15+1G>A) y c.640G>T (p.Glu214*), respectivamente. El paciente 30 presentaba una mutación *COLQ* c.157dupC (p.Leu53Profs*81) en homocigosis.

Cinco mutaciones ya conocidas fueron encontradas en *GFPT1* en siete pacientes de cuatro familias: c.1526T>C (p.Met491Thr), c.1534C>T (p.Arg512Trp), c.1529T>C (p.Met492Thr), c.*22C>A, y c.1332_1335dup (p.Asp446Glyfs*10).

La mutación c.1124_1127dup (p.Ala378Serfs*30) fue la más frecuentemente encontrada en nuestra serie de pacientes con SMC por mutaciones en *DOK7*. La presentaban tres pacientes en homocigosis y otros tres en heterocigosis. También se encontraron las mutaciones c.98C>T (p.Ala33Val) y c.101-1G>T (IVS2-1G>T).

Los pacientes 53-57 portaban en homocigosis las mutaciones *CHRNA1* c.715C>T (p.Arg239Cys), c.753_754delCT (p.Pro251Profs*46), c.459dup (p.Val154Serfs*24) y c.299T>G (p.Leu100Arg). Estas mutaciones producen un síndrome de pterigium múltiple.

Los pacientes 58-60 son tres hermanos de origen egipcio con debilidad muscular con predominio de cinturas, elevación de CK, cataratas y respuesta favorable tras tratamiento con piridostigmina en los que se detectó la mutación *GMPPB* c.553C>T (p.Arg185Cys) en homocigosis.

En los pacientes 63 y 64 se detectaron las mutaciones *CHRNA1* c.592G>A (p.Gly198Ser) y *CHRNBI* c.878T>A (p.Leu293Gln), respectivamente. Ambas producen un síndrome de canal lento.

RESULTADOS

Paciente	Familia	Cambio de nucleotido	Predicción de cambio proteico	Gen
1	1	c.264C>A c.264C>A	p.Asn88Lys p.Asn88Lys	<i>RAPSN</i>
2	2	c.264C>A c.264C>A	p.Asn88Lys p.Asn88Lys	<i>RAPSN</i>
3	3	c.264C>A c.869T>C	p.Asn88Lys p.Leu290Pro	<i>RAPSN</i>
4	4	c.264C>A c.1185delG	p.Asn88Lys p.Thr396Pfs*12	<i>RAPSN</i>
5	5	c.264C>A c.280G>A	p.Asn88Lys p.Glu94Lys	<i>RAPSN</i>
6	6	c.264C>A c.1185delG	p.Asn88Lys p.Thr396Pfs*12	<i>RAPSN</i>
7	6	c.264C>A c.1185delG	p.Asn88Lys p.Thr396Pfs*12	<i>RAPSN</i>
8	6	c.264C>A c.1185delG	p.Asn88Lys p.Thr396Pfs*12	<i>RAPSN</i>
9	7	c.264C>A c.358delC	p.Asn88Lys p.Gln120Serfs*8	<i>RAPSN</i>
10	8	c.264C>A c.493G>A	p.Asn88Lys p.Val165Met	<i>RAPSN</i>
11	9	c.264C>A c.264C>A	p.Asn88Lys p.Asn88Lys	<i>RAPSN</i>
12	10	c.130insG c.1353insG	p.Glu44Glyfs*3 p.Asn542-Glufs*4	<i>CHRNE</i>
13	11	c.130insG c.130insG	p.Glu44Glyfs*3 p.Glu44Glyfs*3	<i>CHRNE</i>
14	12	c.130insG c.1353insG	p.Glu44Glyfs*3 p.Asn542Glufs*4	<i>CHRNE</i>
15	13	c.1353insG c.1353insG	p.Asn542Glufs*4 p.Asn542Glufs*4	<i>CHRNE</i>
16	14	c.1353insG c.1353insG	p.Asn542Glufs*4 p.Asn542Glufs*4	<i>CHRNE</i>
17	15	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	<i>CHRNE</i>
18	15	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	<i>CHRNE</i>
19	15	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	<i>CHRNE</i>
20	15	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	<i>CHRNE</i>
21	15	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	<i>CHRNE</i>
22	15	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	<i>CHRNE</i>

SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

23	16	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	CHRNE
24	16	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	CHRNE
25	16	c.1327delG c.1327delG	p.Glu443Lysfs*64 p.Glu443Lysfs*64	CHRNE
26	17	c.1373_1375delGCT c.1373_1375delGCT	p.Cys478del p.Cys478del	CHRNE
27	18	c.865C>T	p.Leu289Phe	CHRNE
28	19	c.865C>T	p.Leu289Phe	CHRNE
29	20	c.1195+1G>A c.1289A>C	(IVS15+1G>A p.Tyr430Ser	COLQ
30	21	c.157dupC c.157dupC	p.Leu53Profs*81 p.Leu53Profs*81	COLQ
31	22	c.1289A>C c.1289A>C	p.Tyr430Ser p.Tyr430Ser	COLQ
32	23	c.1289A>C c.1289A>C	p.Tyr430Ser p.Tyr430Ser	COLQ
33	24	c.1289A>C c.1289A>C	p.Tyr430Ser p.Tyr430Ser	COLQ
34	25	c.1289A>C c.1289A>C	p.Tyr430Ser p.Tyr430Ser	COLQ
35	26	c.1289A>C c.1289A>C	p.Tyr430Ser p.Tyr430Ser	COLQ
36	27	c.1289A>C c.1289A>C	p.Tyr430Ser p.Tyr430Ser	COLQ
37	28	c.640G>T c.1289A>C	p.Glu214* p.Tyr430Ser	COLQ
38	29	c.1526T>C c.1526T>C	p.Met509Thr p.Met509Thr	GFPT1
39	30	c.1588C>T c.1588C>T	p.Arg530Trp p.Arg530Trp	GFPT1
40	31	c.1529T>C c.*22C>A	p.Met510Thr n/a	GFPT1
41	31	c.1529T>C c.*22C>A	p.Met510Thr n/a	GFPT1
42	31	c.1529T>C c.*22C>A	p.Met510Thr n/a	GFPT1
43	32	c.1332_1335dup c.*22C>A	p.Asp446Glyfs*10 n/a	GFPT1
44	32	c.1332_1335dup c.*22C>A	p.Asp446Glyfs*10 n/a	GFPT1
45	33	c.686-2A>G c.686-2A>G	IVS8-2A>G IVS8-2A>G	GFPT1

RESULTADOS

46	34	c.98C>T c.1124_1127dup	p.Ala33Val p.Ala378Serfs*30	<i>DOK7</i>
47	35	c.1124_1127dup c.1124_1127dup	p.Ala378Serfs*30 p.Ala378Serfs*30	<i>DOK7</i>
48	35	c.1124_1127dup c.1124_1127dup	p.Ala378Serfs*30 p.Ala378Serfs*30	<i>DOK7</i>
49	36	c.1124_1127dup c.101-1G>T	p.Ala378Serfs*30 IVS2-1G>T	<i>DOK7</i>
50	37	c.1124_1127dup c.1124_1127dup	p.Ala378Serfs*30 p.Ala378Serfs*30	<i>DOK7</i>
51	38	c.1124_1127dup c.54+12_54+23del	p.Ala378Serfs*30 n/a	<i>DOK7</i>
52	38	c.1124_1127dup c.54+12_54+23del	p.Ala378Serfs*30 n/a	<i>DOK7</i>
53	39	c.715C>T c.715C>T	p.Arg239Cys p.Arg239Cys	<i>CHRNA1</i>
54	40	c.687_688delCT c.687_688delCT	p.Pro251Profs*46 p.Pro251Profs*46	<i>CHRNA1</i>
55	41	c.459dup c.459dup	p.Val154Serfs*24 p.Val154Serfs*24	<i>CHRNA1</i>
56	41	c.459dup c.459dup	p.Val154Serfs*24 p.Val154Serfs*24	<i>CHRNA1</i>
57	42	c.299T>G c.299T>G	p.Leu100Arg p.Leu100Arg	<i>CHRNA1</i>
58	43	c.553C>T c.553C>T	p.Arg185Cys p.Arg185Cys	<i>GMPPB</i>
59	43	c.553C>T c.553C>T	p.Arg185Cys p.Arg185Cys	<i>GMPPB</i>
60	43	c.553C>T c.553C>T	p.Arg185Cys p.Arg185Cys	<i>GMPPB</i>
61	44	c.1231G>A c.1300G>A	p.Gly411Arg p.Gly434Ser	<i>CHAT</i>
62	45	c.1249G>A c.1505T>C	p.Gly417Arg p.Leu502Pro	<i>CHAT</i>
63	46	c.592G>A	p.Gly198Ser	<i>CHRNA1</i>
64	47	c.878T>A	p.Leu293Gln	<i>CHRNA1</i>

Tabla 4. Mutaciones encontradas en los 64 pacientes con SMC. Las seis mutaciones que no habían sido descritas previamente están destacadas en amarillo. Para la notación de las variantes se emplearon las siguientes transcritos: RAPSN ENST00000298854; CHRNE ENST00000293780; COLQ ENST00000383788; GFPT1 ENST00000357308; DOK7 ENST00000340083; CHRNA1 ENST00000389494; GMPPB ENST00000308375; CHAT ENST00000337653; CHRNA1 ENST00000261007; CHRNA1 ENST00000306071.

V.1.2 RESULTADOS CLÍNICOS DE LOS SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN ESPAÑA.

Los hallazgos clínicos individuales de los 64 pacientes en el momento de ser evaluados se encuentran resumidos en la **Tabla 5**. Todos los pacientes con *CHRNE* tenían ptosis. También se observó ptosis en la mayoría de pacientes con *DOK7* y *RAPSN*, pero no la presentó ningún paciente con mutaciones en *GFPT1*. La oftalmoparesia fue un signo presente en trece de los catorce pacientes con mutaciones en *CHRNE*, pero es muy infrecuente en pacientes con otros subtipos de SMC. La debilidad cervical estaba presente en la mayoría de pacientes con SMC, independientemente del gen afectado (la presentaban más del 80% de pacientes con mutaciones en *DOK7* y *RAPSN*). La debilidad bulbar, manifestada como dificultades para masticar o tragar estaba presente en casi dos terceras partes de los pacientes con mutaciones en *CHRNE* y era menos frecuente en el resto de subtipos, no observándose en ninguno de los pacientes con SMC por mutaciones en *GFPT1*. Es reseñable la ausencia de debilidad bulbar en el momento de la exploración en la mayoría de los pacientes con mutaciones en *RAPSN*, a pesar de haberla presentado en los episodios de apneas que todos ellos presentaron durante su infancia. La exploración física objetivó la presencia de debilidad proximal en todos los pacientes con mutaciones en *GFPT1*, *COLQ* y *DOK7*. También fue frecuente su presencia en pacientes con SMC por *CHRNE* y *RAPSN*, pero no se observó en todos. La mayor prevalencia de afectación en la capacidad de marcha, definida como la imposibilidad de deambular autónomamente al menos 350 metros, fue encontrada en los pacientes con SMC por *DOK7* y *GFPT1* (71% y 38%, respectivamente). La **Figura 6** ilustra los hallazgos clínicos asociados con cada uno de los genes más frecuentemente afectados. En la **Figura 7** se muestran las imágenes de algunos pacientes que ilustran las características descritas.

RESULTADOS

El retraso medio desde el debut clínico hasta el diagnóstico genético fue de 10,89 años (mediana 7 años; rango 0-47,5 años). En el 38,5% de los pacientes (20/52) transcurrieron más de 10 años desde la aparición de la sintomatología hasta que se obtuvo el diagnóstico genético definitivo. En cualquier caso, muchos de estos pacientes ya habían sido diagnosticados de miastenia por los datos clínicos y recibían tratamiento con piridostigmina antes de tener un diagnóstico genético.

Se realizó biopsia muscular en 25 de los 64 pacientes. En 15 se objetivó una variabilidad en el tamaño de las fibras y en 12 un predominio de fibras tipo I. En los pacientes con mutaciones en *GMPPB* se observó un patrón distrófico con fibrosis, necrosis y fibras regenerativas. No se encontraron otros hallazgos en ninguna de las biopsias realizadas.

En todos los pacientes se realizó electromiograma y se midieron las velocidades de conducción nerviosa. La existencia de un decremento en el potencial de acción tras estimulación repetitiva a bajas frecuencias se objetivó en un 25% de los pacientes pediátricos y en más del 75% de pacientes adultos (no se incluyen a los pacientes con mutaciones en *COLQ* o síndrome de canal lento en estos porcentajes). En más de un 75% de pacientes con mutaciones en *COLQ* o síndrome de canal lento se objetivó un doble potencial ante un estímulo único.

SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

Paciente	Gen	Sexo	Edad al debut	Primeros síntomas	Retraso motor/ Edad deambulación	Edad al diagnóstico genético	Edad en la última revisión (años)	Ptosis/ Oftalmoparesia/ Debilidad facial /Distagia	Debilidad proximal/ Debilidad distal	Debilidad cervical/ Escoliosis	Curso enfermedad	Tratamiento actual	Afectación deambulación
1	RAPSN	F	neo	Distrés respiratorio (cVM), hipotonía, succión débil	- / 12 m	1 m	6	- / - / + / -	+ / -	+ / -	EX	Pir	No
2	RAPSN	F	neo	Distrés respiratorio (sVM), hipotonía, succión débil	+ / 24 m	1 m	10	- / - / - / -	- / -	+ / -	EX	Pir	No
3	RAPSN	M	neo	Distrés respiratorio (cVM), hipotonía, succión débil	+ / 26 m	6 m	6	+ / + / + / -	- / -	+ / -	EX	Pir	No
4	RAPSN	M	neo	Hipotonía, succión débil	- / 13 m	4 m	4	- / - / - / -	- / -	- / -	EX	Pir	No
5	RAPSN	F	neo	Hipotonía, succión débil	- / 14 m	2.2 a	10	- / - / - / -	- / -	+ / -	EX	No	No
6	RAPSN	M	neo	Distrés respiratorio (sVM), Hipotonía, succión débil	- / 12 m	15 a	43	+ / - / - / -	+ / -	+ / -	EX	Pir + 3,4-DAP	No
7	RAPSN	M	neo	Hipotonía, succión débil	- / 15 m	25 a	53	+ / - / - / +	+ / -	+ / -	EX	Pir	No
8	RAPSN	M	neo	Hipotonía, succión débil	- / 12 m	20 a	48	+ / - / + / +	+ / -	- / -	EX	Pir + 3,4-DAP	No
9	RAPSN	M	neo	Distrés respiratorio (sVM), hipotonía, succión débil, retracciones	- / 13 m	1.5 a	2	- / - / + / -	- / -	+ / -	EX	Pir	No
10	RAPSN	F	neo	Distrés respiratorio (cVM), hipotonía, succión débil, retracciones	- / 12 m	7 a	24	+ / - / - / -	+ / -	+ / -	EX	Pir	No
11	RAPSN	F	2 m - 1 a	Hipotonía	+ / 19 m	nd	28	+ / - / + / -	+ / +	+ / +	EX	Pir + Efed + Salb	Sí
12	CHRNE	F	4 m	Ptosis	- / 12 m	4 a	21	+ / + / - / -	- / -	- / -	EST/ LP	Pir	No
13	CHRNE	F	6 m	Ptosis, oftalmoparesia	- / 16 m	4 a	11	+ / + / - / -	- / -	- / -	EST/ LP	No	No

RESULTADOS

14	CHRNE	F	1 m	Hipotonía, oftalmoparesia, succión débil	+ / 36 m	12 m	19	+/+/+/+	+ / -	+ / +	PROG	Pir + 3,4-DAP + Salb	Sí
15	CHRNE	F	1 m	Hipotonía, ptosis, oftalmoparesia	+ / 19 m	7 a	53	+/+/+/-	+ / -	+ / nd	EST/ LP	Pir + 3,4-DAP	Sí
16	CHRNE	F	1 m	Hipotonía, oftalmoparesia, succión débil	- / 13 m	nd	8	+/+/-/+	+ / -	- / -	EST/ LP	Pir	No
17	CHRNE	F	1 m	Hipotonía, oftalmoparesia, succión débil	+ / 24 m	10 a	20	+/+/+/+	+ / -	+ / +	PROG	Pir	Sí
18	CHRNE	F	9 a	Ptosis, oftalmoparesia	- / 13 m	9 a	16	+/+/-/-	- / -	- / -	EST/ LP	Pir	No
19	CHRNE	M	1 m	Hipotonía, oftalmoparesia, succión débil	- / 18 m	1 m	8	+/+/+/+	- / -	+ / -	EST/ LP	Pir	No
20	CHRNE	F	1 a	Ptosis	+ / 20 m	1 a	8	+/+/+/+	- / -	- / -	EST/ LP	Pir	No
21	CHRNE	F	2 a	Ptosis	- / 12 m	22 a	34	+/+/+/+	+ / -	+ / -	EST/ LP	Pir	No
22	CHRNE	M	2 a	Ptosis	- / 13 m	30 a	30	+/+/+/+	+ / -	- / -	EST/ LP	Pir	No
23	CHRNE	M	1 m	Distrés respiratorio (sVM), hipotonía, oftalmoparesia, succión débil	- / 18 m	2.5 a	30	+/+/+/+	+ / -	+ / +	EX	Pir + 3,4-DAP	Sí
24	CHRNE	F	1 m	Hipotonía, oftalmoparesia, succión débil	- / 18 m	6 a	32	+/+/+/+	+ / -	+ / +	PROG	Pir + 3,4-DAP	Sí
25	CHRNE	F	6 a	Ptosis	- / 12 m	8 a	20	+/+/-/-	+ / -	- / -	EST/ LP	Pir + 3,4-DAP	No
26	CHRNE (Canal lento)	M	neo	Hipotonía, ptosis, succión débil	- / 18 m	6 m	23	+/+/-/-	- / +	+ / -	EST/ LP	Fluox	No
27	CHRNE (Canal lento)	F	neo	Hipotonía, ptosis, succión débil, debilidad facial	- / 14 m	10 m	21	+ / - / + / +	+ / +	+ / +	EST/ LP	Fluox	Sí
28	CHRNE	M	neo	Hipotonía, ptosis, succión débil, debilidad facial	- / 16 m	16 m	4	+/+/+/+	+ / +	+ / -	EX	Pir	No
29	COLQ	F	2 m	Fatigabilidad, debilidad cervical	- / 12 m	10 a	20	- / - / - / -	+ / -	+ / -	EST/ LP	Efed	No
30	COLQ	M	neo	Hipotonía	+ / 20 m	15 a	25	+ / - / - / +	+ / -	+ / -	EST/ LP	Efed	Sí
31	COLQ	F	6 a	Debilidad cinturas, caídas	- / antes 18 m	6 a	31	+ / - / + / +	+ / -	+ / -	EST/ LP	Efed	Sí

SÍNDROMES MIASTÉNICOS CONGÉNITOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

32	COLQ	F	7 a	Debilidad cinturas	- / antes 18 m	10 a	45	+ / - / - / -	+ / -	+ / -	EST/ LP	Efed	No
33	COLQ	F	8 a	Debilidad cinturas	- / antes 18 m	nd	38	- / - / - / -	+ / -	- / -	EST/ LP	Efed	No
34	COLQ	M	< 1 a	Hipotonía	- / antes 18 m	nd	nd	- / - / - / -	+ / -	- / -	EST/ LP	Efed	No
35	COLQ	F	5 a	Debilidad cinturas	- / antes 18 m	42 a	47	- / - / - / -	+ / -	+ / +	PROG	Efed	No
36	COLQ	F	10 a	Fatigabilidad	- / antes 18 m	70 a	80	- / - / - / -	+ / -	- / +	EST/ LP	Efed	No
37	COLQ	F	18 m	Fatigabilidad, debilidad cinturas	- / 16 m	15 a	15	- / - / - / -	+ / -	- / -	EST/ LP	Salb	No
38	GFPT1	M	7 a	Debilidad cinturas, caídas	- / 12 m	8 a	22	- / - / - / -	+ / -	+ / -	EST/ LP	Pir + 3,4-DAP	No
39	GFPT1	F	3 a	Debilidad cinturas	- / 15 m	nd	10	- / - / - / -	+ / -	+ / -	EST/ LP	Pir + 3,4-DAP	Sí
40	GFPT1	M	10 a	Debilidad cinturas, caídas	- / antes 18 m	nd	57	- / - / - / -	+ / -	+ / -	EST/ LP	Pir + 3,4-DAP	No
41	GFPT1	M	14 a	Debilidad cinturas	- / antes 18 m	nd	62	- / - / - / -	+ / -	- / -	EST/ LP	Pir	No
42	GFPT1	F	40 a	Debilidad cinturas	- / antes 18 m	40 a	61	- / - / - / -	+ / -	- / -	EST/ LP	Pir	No
43	GFPT1	M	5 a	Debilidad cinturas	- / antes 18 m	28 a	43	- / - / - / -	+ / -	+ / -	PROG	Efed	No
44	GFPT1	F	1 a	Debilidad cinturas, caídas	- / 18 m	25 a	41	- / - / - / -	+ / +	+ / -	PROG	Pir + 3,4-DAP + Efed	Sí
45	GFPT1	F	neo	Hipotonía, succión débil	+ / 20 m	21 a	22	- / - / - / -	+ / +	+ / +	PROG	Pir	Sí
46	DOK7	F	neo	Hipotonía	+ / 24 m	19 a	26	+ / - / + / +	+ / -	+ / -	EST/ LP	Salb	Lige ro
47	DOK7	M	22 a	Trastorno marcha	- / antes 18 m	nd	58	+ / - / - / -	+ / -	+ / -	EX	No	No
48	DOK7	F	25 a	Trastorno marcha	- / antes 18 m	nd	60	+ / - / - / -	+ / -	+ / -	EX	3,4-DAP	No
49	DOK7	F	2 a	Caídas	- / 15 m	nd	35	+ / - / + / -	+ / -	+ / -	PROG + EX	Efed	Sí
50	DOK7	F	25-30 a	Trastorno marcha	- / antes 18 m	75 a	78	- / - / - / -	+ / -	- / -	PROG	Efed	Sí
51	DOK7	F	neo	Hipotonía, llanto débil	- / 15 m	19 a	19	- / - / + / +	+ / -	+ / +	EX	Efed	Sí
52	DOK7	F	3 a	Trastorno marcha	- / 12 m	13 a	13	- / - / + / +	+ / -	+ / +	EX	Efed	Sí
53	CH RNG	F	neo	Artrogriposis, succión débil	- / 18 m	14 a	19	- / - / + / +	+ / -	+ / -	EST/ LP	No	No
54	CH RNG	F	neo	Artrogriposis,	+ / 20	nd	7	- / - / + / +	- / -	+ / -	EST/	No	No

RESULTADOS

				succión débil	m						LP		
55	CHRNA1	M	neo	Artrogriposis, succión débil	- / antes 18 m	18 a	18	- / - / + / +	+ / -	+ / -	EST / LP	No	Sí
56	CHRNA1	M	neo	Artrogriposis, succión débil	- / antes 18 m	13 a	13	- / - / + / +	+ / -	+ / -	EST / LP	No	Sí
57	CHRNA1	F	neo	Artrogriposis	- / antes 18 m	3 a	3	- / - / - / -	- / -	- / -	EST / LP	No	No
58	GMPPB	F	neo	Hipotonía	- / antes 18 m	12 a	12	- / - / - / +	+ / +	+ / +	EST / LP	Pir	Sí
59	GMPPB	M	neo	Hipotonía, succión débil,	+ / después 18 m	16 a	16	- / - / - / +	+ / +	+ / +	EST / LP	Pir	Sí
60	GMPPB	M	neo	Displasia congénita caderas	- / 13 m	7 a	7	- / - / - / +	+ / -	+ / +	EST / LP	Pir	No
61	CHAT	F	4 a	Debilidad distal	- / antes 18 m	26 a	26	- / - / - / -	- / +	- / -	EST / LP	Pir	No
62	CHAT	M	neo	Distrés respiratorio (cVM), hipotonía, succión débil, retracciones	nd	3 a	7 m	+ / - / + / +	- / +	+ / -	nd	Pir + 3,4-DAP	Nd
63	CHRNA1 (Canal lento)	F	28 a	Debilidad proximal	- / antes 18 m	35 a	49	- / - / + / -	+ / -	+ / -	EST / LP	Efed	No
64	CHRNA1 (Canal lento)	M	1 a	Hipotonía, retraso motor	+ / 19 m	2.5 a	3	+ / - / + / +	+ / -	+ / -	EST / LP	Salb	No

Tabla 5. Datos clínicos de los 64 pacientes con diagnóstico genético de SMC. Se muestran las características clínicas de los pacientes en el momento de ser explorados en la última revisión. Los pacientes con síndrome de canal lento están señalados en amarillo.

+: sí presente; -: no presente; neo: periodo neonatal, m: meses, a: años; Pir: piridostigmina; Salb: salbutamol; Fluox: fluoxetina; Efed: efedrina; EX: exacerbaciones; PROG: progresiva; EST/LP: estable o lenta progresión; cVM: con ventilación mecánica; sVM: sin ventilación mecánica; nd: no disponible.

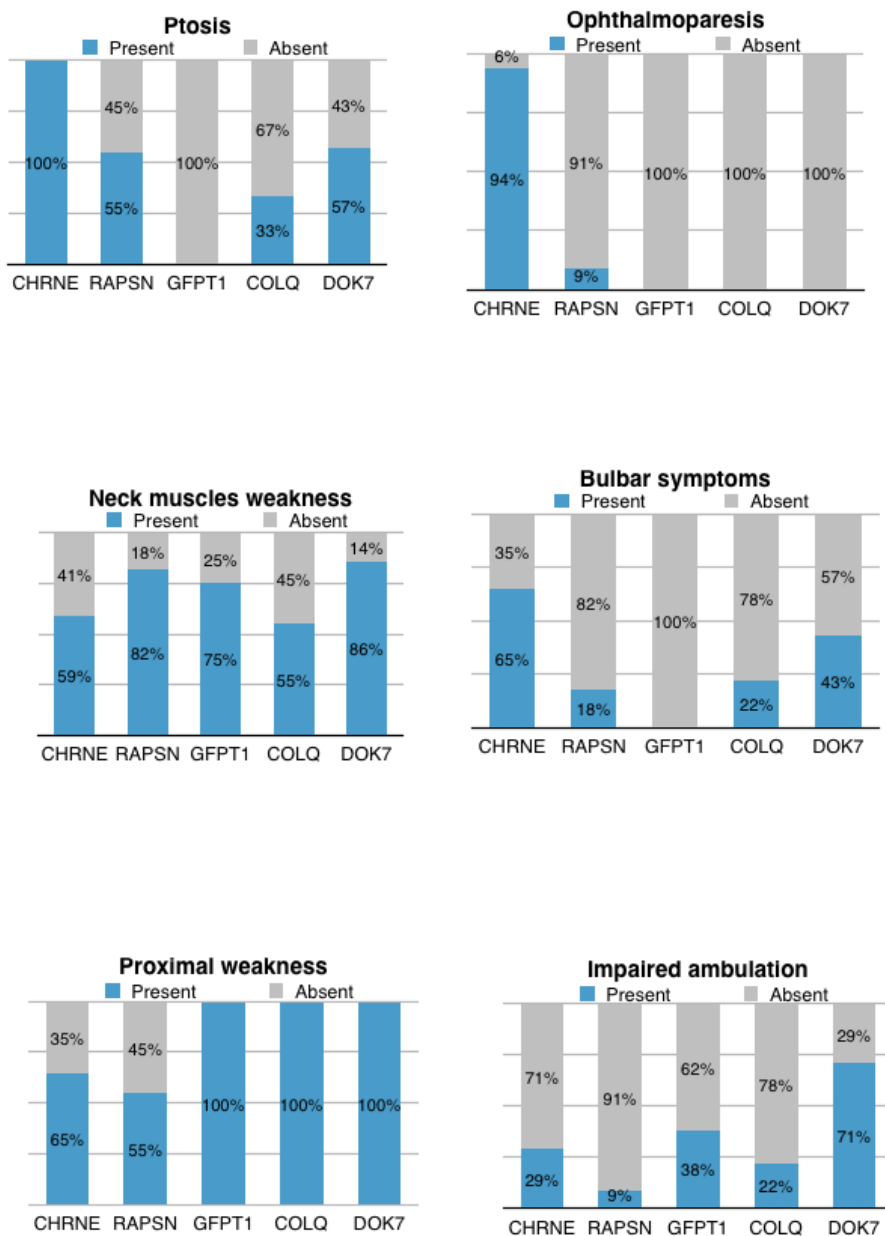


Figura 6. Síntomas según el defecto genético encontrado. A) La ptosis estuvo presente en todos los pacientes con mutaciones en *CHRNE* que no presentaban un síndrome de canal lento. B) La oftalmoparesia es un signo muy específico del SMC por mutaciones en *CHRNE*. C) La debilidad cervical estaba presente en la mayoría de pacientes con un SMC. D) El porcentaje más alto de sintomatología bulbar se encontró en el SMC por *CHRNE*. E) Todos los pacientes con SMC por *GFPT1*, *COLQ* y *DOK7* presentaban debilidad proximal. En cambio, no fue un signo constante en los pacientes con mutaciones en *CHRNE* y *RAPSN*. F) Aproximadamente un tercio de los pacientes presenta dificultades para la deambulacion, con variaciones en función de la localización de la alteración genética. La prevalencia más alta se encontró en los pacientes con mutaciones en *DOK7*.

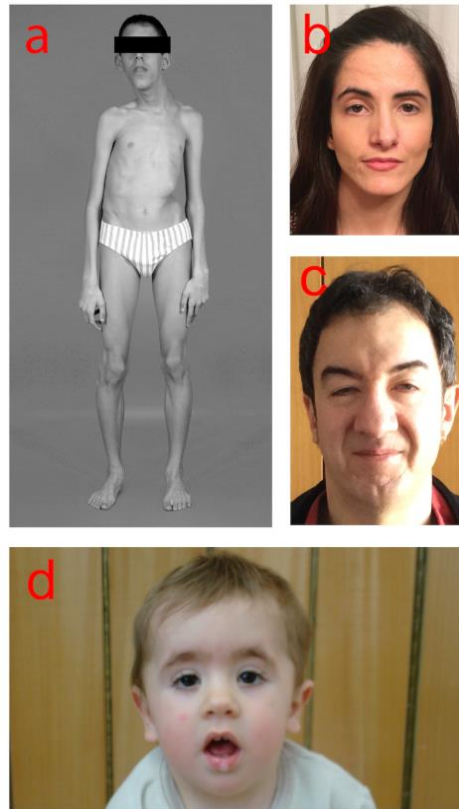


Figura 7. Imágenes representativas de algunos pacientes con distintos subtipos de SMC, por cortesía de los Dres Colomer, Nascimento y Ortez. a) Vista frontal de cuerpo entero un paciente con síndrome de canal lento por mutación en *CHRNE* a los 16 años, antes de inicio de tratamiento con fluoxetina. Obsérvese atrofia muscular generalizada, con particular afectación de los extensoderes de la muñeca, y marcada escoliosis. b) Visión frontal de una paciente con SMC por mutaciones en *DOK7* a los 28 años. Destaca la ptosis bilateral y una discreta debilidad facial. c) Facies de un paciente con mutaciones en *RAPSN* a los 48 años, en tratamiento con piridostigmina y 3,4-DAP. Se aprecia ptosis sin otros signos asociados. d) Paciente con mutaciones en *RAPSN* a los 16 meses en tratamiento con piridostigmina. Se aprecia ptosis y debilidad facial moderada.

V.2 ESTUDIO 2: SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO DE PACIENTES CON SÍNDROME MIASTÉNICO CONGÉNITO POR MUTACIONES EN *RAPSN*.

En este estudio hacemos una descripción pormenorizada de los hallazgos clínicos en diez pacientes (seis varones y cuatro mujeres) de 8 familias diferentes con SMC por mutaciones en *RAPSN*. Se llevó a cabo un seguimiento clínico a largo plazo durante un periodo de tiempo medio de 14,5 años (rango: 1-28 años), con exploraciones clínicas periódicas. Tratamos de poner de manifiesto cuales son los signos clínicos típicos de este tipo de SMC para tratar de facilitar su reconocimiento y diagnóstico.

La edad media a la primera exploración fue de 6 años (7 de los 10 pacientes fueron explorados por primera vez durante el periodo neonatal). La edad de los pacientes en la última revisión varió entre 2 y 53 años. Los hallazgos clínicos de los pacientes se resumen en la Tabla 1 del artículo original (Anexo 1). Se muestran fotografías representativas en las Figuras 1-3 del artículo original (Anexo 1).

V.2.1 EDAD DE DEBUT DE LOS SMC POR *RAPSN* Y FENOTIPO CLÍNICO.

Los primeros signos y síntomas de la enfermedad aparecieron en las primeras horas de vida en todos los pacientes. El 67% de las madres que fueron preguntadas al respecto refirieron que ya habían apreciado previamente una disminución de los movimientos fetales. Ninguno de los casos presentó polihidramnios. En todos los casos se objetivó hipotonía y dificultades para la succión. En seis de los diez casos se asoció insuficiencia respiratoria, que requirió soporte ventilatorio en cuatro de ellos. Tres de

ellos precisaron ventilación mecánica. Dos de los pacientes presentaron artrogriposis múltiple congénita.

El retraso en la adquisición de los hitos motores fue más la excepción que la norma: ocho de los diez pacientes adquirieron la capacidad de deambulación autónoma antes de los 18 meses de edad. En dos de los pacientes se observó un leve retraso en el desarrollo motor, probablemente secundario a otras patologías asociadas (esquiencefalia en uno de los pacientes e infarto de la arteria cerebral media en el otro) y sin relación con el SMC.

En todos los pacientes se objetivó la presencia de ptosis bilateral tras exploraciones neurológicas repetidas, aunque hasta en la mitad de los casos esta era indetectable durante la mayor parte del día. Sólo se objetivó la presencia de oftalmoparesia en un paciente y ninguno presentó oftalmoplejia. Aunque los otros nueve pacientes eran aparentemente capaces de movilizar sus ojos sin limitaciones, todos ellos refirieron la presencia de diplopía intermitente con la mirada lateral. Uno de ellos presentaba, además, un estrabismo intermitente. Tanto la diplopía como el estrabismo fueron parcialmente resueltos con el inicio del tratamiento farmacológico.

Cuatro de los diez pacientes presentaron debilidad bulbar en forma de dificultades para masticar o deglutir. En todos los casos fue leve y fluctuante. Cuatro de los pacientes presentaban afectación de la musculatura facial. En cinco de los pacientes existía debilidad muscular proximal (de intensidad leve en cuatro de ellos y moderada en uno) y en ninguno de ellos se objetivó una debilidad distal significativa. Ningún paciente presentó escoliosis.

Todos los pacientes mostraron una respuesta francamente beneficiosa tras el inicio de tratamiento con anticolinesterásicos. La dosis media de piridostigmina fue 7,6 mg/kg/día en la población pediátrica (rango desde 4.5 a 10 mg/kg/día) y 200 mg/día en los adultos (rango desde 180 a 240 mg/día), divididos en 3-5 dosis diarias. En la mayoría de los casos el tratamiento fue instaurado de forma precoz (mediana de retraso diagnóstico: 22 meses; retraso diagnóstico medio: 42 meses). El tratamiento se inició a una edad media de 8.9 años (rango: 2 meses-30 años). Debido a la respuesta clínica favorable, todos los pacientes excepto uno mantuvieron tratamiento diario con anticolinesterásicos. Una paciente recibe piridostigmina sólo durante los episodios de crisis o empeoramiento clínico. No se comunicó ningún efecto adverso significativo en ninguno de los pacientes. En tres pacientes se asoció tratamiento con 3,4-DAP a una edad media de 30 años. Fue instaurado a una dosis de 10-20 mg dividido en tres dosis diarias. Se observó una mejoría notable en los tres casos y permitió reducir la dosis de piridostigmina. La 3,4-DAP fue retirada posteriormente en uno de estos tres pacientes debido a la aparición de diarrea como efecto adverso. Los tres pacientes refirieron discretas parestesias periorales y en dedos que no hicieron necesario el ajuste de dosis. Uno de los pacientes recibió tratamiento asociado con efedrina, pero tuvo que ser retirada debido a la aparición de incontinencia urinaria.

A pesar del tratamiento, todos los pacientes siguieron presentando exacerbaciones episódicas precipitadas por infecciones menores, fiebre, o incluso sin un desencadenante evidente. Dos de los casos requirieron soporte ventilatorio durante una o más de estas crisis. Aunque todos ellos continuaron experimentando exacerbaciones episódicas, a partir de los 6 años de edad las crisis se caracterizaron por la presencia de

debilidad proximal de cinturas y ptosis y, menos frecuentemente, por insuficiencia respiratoria. Las exacerbaciones tendieron a disminuir en frecuencia y severidad con la edad.

Ninguno de los pacientes requirió soporte ventilatorio nocturno. Ninguno presentó afectación a nivel cognitivo. Para cuantificar la fatigabilidad con mayor precisión de los diferentes grupos musculares, se empleó la escala QMG en ocho de los pacientes (Tabla 2 de la publicación original. Anexo 1). Las mediciones para diplopía y ptosis mostraron que existía una afectación en todos los pacientes. Los tiempos empleados para deglutir, elevar la cabeza, el tiempo de elevación de extremidades superiores y el tiempo de elevación de extremidades inferiores mostró una alteración con respecto al límite de lo normal en, al menos, la mitad de los pacientes examinados. Las puntuaciones para la fuerza de prensión con la mano, contar, y levantarse desde el suelo fueron normales. Todos los pacientes caminaron una distancia dentro del rango normal para su edad en el 6-minute walking test (6MWT).

V.2.2 EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA, PRUEBAS DE LABORATORIO Y ESTUDIOS DE ANATOMÍA PATOLÓGICA EN PACIENTES CON SMC POR *RAPSN*.

Se realizaron estudios de conducción nerviosa motora y sensitiva en nueve de los diez pacientes, con resultado normal en todos ellos. En uno de los nueve pacientes se observó la presencia de un doble potencial de acción en respuesta a un estímulo nervioso único. Este paciente estaba siendo tratado con piridostigmina y 3,4-DAP en el momento de este estudio, pudiendo interferir en el resultado. En el resto de los pacientes los estudios fueron realizados sin recibir tratamiento farmacológico. En cuatro de los nueve pacientes se objetivó la presencia de una respuesta decremental tras estimulación

nerviosa repetitiva. Se llevaron a cabo estudios electromiográficos en los mismos nueve pacientes, revelando hallazgos miopáticos en cuatro de ellos. Los resultados de los estudios electrofisiológicos se resumen en la Tabla 3 de la publicación original (Anexo 1).

En ninguno de los pacientes en los que se realizó estudio inmunológico se detectó la presencia de anticuerpos anti receptor de acetilcolina (0/6). Los niveles de creatinquinasa estuvieron dentro del rango normal en todos los pacientes. En dos de los pacientes se realizó una biopsia muscular, dado que el diagnóstico de sospecha inicial fue el de miopatía congénita. En ambos se observó variación en el tamaño de las fibras. No se observó predominio de fibras tipo I en ninguno de ellos. Los estudios inmunohistoquímicos resultaron normales. Los resultados de los estudios de anatomía patológica se resumen en la Tabla 3 de la publicación original (Anexo 1).

V.2.3 GENÉTICA MOLECULAR DE LA MUESTRA DE PACIENTES CON SMC POR *RAPSN*.

Todos los pacientes presentaban la mutación patogénica c.264C>A; p.Asn88Lys en al menos uno de sus alelos. Dos de los pacientes presentaban esta mutación en homocigosis y ocho pacientes de seis familias diferentes en heterocigosis con una segunda mutación. Se encontraron mutaciones frameshift en seis pacientes (c.1185delG; p.Thr396Pfs*12 y c.358delC; p.Gln120Serfs*8) y mutaciones missense en dos (c.280G>A;p.Glu94Lys, c.493G>A;p.Val165Met y c.869T>C;p.Leu290Pro). Las variantes missense c.493G>A;p.Val165Met y c.869T>C;p.Leu290Pro fueron interpretadas como “patogénicas” o “probablemente patogénicas” por herramientas de predicción *in silico*. Estas últimas tres mutaciones no había sido recogida en el

momento de publicación de este trabajo por ninguna de las bases de datos clínicas disponibles (HGMD y LOVD) y no se encuentran dentro de aquellas variantes encontradas en una población control de más de 60.000 individuos (ExAC).

V.3 ESTUDIO 3: HETEROGENEIDAD EN EL FENOTIPO DE PACIENTES DE DOS FAMILIAS ROMANÍES CON SÍNDROME MIASTÉNICO CONGÉNITO POR LA MUTACIÓN *CHRNE* 1267DELG. UN SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO.

En este trabajo presentamos una serie de pacientes con la misma mutación *CHRNE* 1267delG, con una moderada variabilidad en el fenotipo clínico. Para hacer referencia a esta mutación también se puede emplear la nueva notación *CHRNE* c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64).

Fuimos capaces de reconstruir el árbol genealógico de las dos familias, recogiendo un total de 68 y 108 miembros de seis y siete generaciones, respectivamente (Figura 1 de la publicación original. Anexo 2). Entrevistamos y exploramos a un total de 14 miembros aparentemente afectados. Todos los pacientes eran españoles de etnia romaní y la mayoría de ellos tenían antecedentes de consanguinidad. Nueve de los pacientes eran homocigotos para la mutación 1267delG de *CHRNE*. Seis mujeres y tres varones. Los pacientes fueron explorados por primera vez a una edad media de 9.6 años (rango desde periodo neonatal a 30 años). El periodo medio de seguimiento clínico fue 11,6 años (rango de 1 a 26 años). En el momento de la última evaluación, los pacientes tenían entre 8 y 34 años. Los datos clínicos de los nueve pacientes que tenían la mutación c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64) en homocigosis están resumidos en la Tabla 1 de la publicación original (Anexo 2). Mostramos una fotografía representativa en la Figura 2 de la publicación original (Anexo 2).

V.3.1 EDAD DE DEBUT Y FENOTIPO CLÍNICO DE PACIENTES CON SMC POR MUTACIÓN CHRNE 1267DELG EN HOMOCIGOSIS.

La aparición de los primeros síntomas se produjo entre las primeras semanas de vida y los 9 años de edad (media 2,2 años; mediana 12 meses). No se objetivó la presencia de artrogriposis ni otras manifestaciones clínicas prenatales en ninguno de los pacientes. Cuatro pacientes debutaron clínicamente durante el primer mes de vida; todos ellos presentaron hipotonía, llanto y succión débiles, y oftalmoparesia. Tres de estos cuatro pacientes presentaron insuficiencia respiratoria asociada, requiriendo soporte respiratorio uno de ellos. Tres pacientes debutaron entre los 12 y los 24 meses de edad, todos ellos con ptosis. En dos de los pacientes no se apreció ninguna clínica hasta después de los 6 años de edad, con una presentación en forma de ptosis y oftalmoparesia.

El retraso en el desarrollo psicomotor es infrecuente: siete de los nueve pacientes adquirieron la capacidad de deambulación autónoma antes de los 18 meses. En cualquier caso, la media y mediana de edad de adquisición de la marcha fue significativamente mayor que en la población normal (media: 16,4 meses; mediana: 18 meses; rango: 12-24 meses). Se objetivó la presencia de oftalmoparesia y ptosis simétrica bilateral en los nueve pacientes. Siete de los pacientes presentaron debilidad facial y sintomatología bulbar, aunque ninguno requirió dieta triturada. Seis de los pacientes presentaron debilidad muscular proximal, que fue de carácter leve en tres (pacientes A-VI.28, A-V.7 y A-V.11), moderado en uno (paciente B-V.5) y severo en dos (pacientes B-V.1 y B-V.4). El paciente B-V.4 precisó del empleo de silla de ruedas desde los 12 años y otros dos pacientes presentaron importantes restricciones para la deambulación autónoma, siendo incapaces de deambular de forma autónoma más de

350 metros. No se objetivó la presencia de debilidad distal significativa en ninguno de los pacientes. Se apreció una afectación selectiva en la musculatura flexora del cuello en cinco pacientes. Tres pacientes presentaron escoliosis. Los datos de todos estos pacientes se muestran en la Tabla 1 de la publicación original (Anexo 2).

La sintomatología respiratoria no fue frecuente en nuestra serie de pacientes: sólo dos presentaron episodios de empeoramiento clínico que requirieron de soporte ventilatorio durante los primeros años de vida. Estas exacerbaciones se produjeron en contexto de infecciones menores, fiebre o sin un desencadenante claro. Ningún paciente requirió soporte ventilatorio. Ninguno presentó afectación a nivel cognitivo.

El curso de la enfermedad fue estable o lentamente progresivo en seis pacientes. Dos pacientes presentaron una progresión relativamente rápida (pacientes A-VI.28 y B-V.4). En una de los pacientes el empeoramiento estuvo asociado al embarazo (paciente A-VI.28). Es reseñable que un paciente (paciente B-V.1) presentó unas fluctuaciones clínicas significativas con periodos de empeoramiento clínico que duraron meses o años, con una posterior recuperación al estado previo. Llegó a perder la capacidad de deambulación autónoma durante dos años en el contexto de una de las mencionadas exacerbaciones. En un apartado más adelante se describen con más detalle tres casos representativos de los diversos cursos clínicos descritos.

V.3.2 ESTUDIOS NEUROFISIOLÓGICOS Y DE LABORATORIO EN PACIENTES CON SMC POR MUTACIÓN *CHRNE* 1267DELG EN HOMOCIGOSIS.

Se realizaron estudios de conducción nerviosa en ocho de los nueve pacientes, siendo normal en todos ellos. No se objetivó la presencia de doble potencial en ninguno

de ellos. En dos de los ocho pacientes se observó la presencia de una respuesta decremental tras estimulación nerviosa. Se realizó electromiografía en ocho pacientes, con hallazgos miopáticos en tres de ellos. Los resultados de los estudios electromiográficos se encuentran resumidos en Tabla 2 de la publicación original (Anexo 2).

Se analizó la presencia de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina en cinco pacientes, sin detectar su presencia en ninguno de ellos. Los niveles de creatinquinasa fueron normales en los cinco pacientes en los que se analizaron. En tres de los pacientes se realizó biopsia muscular, ya que la primera sospecha diagnóstica fue una miopatía. En los tres se observó la presencia de variación del tamaño de fibras. En uno de los casos se objetivó predominio de fibras tipo I. Ninguna de las biopsias mostró agregados con las tinciones histoquímicas aplicadas. Los resultados de los estudios anatomopatológicos se encuentran resumidos en la Tabla 2 de la publicación original (Anexo 2).

V.3.3 RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON SMC POR MUTACIÓN *CHRNE* 1267DELG EN HOMOCIGOSIS.

En los nueve pacientes en los que se instauró tratamiento con piridostigmina como primera línea hubo una respuesta positiva, aunque esta no fue completa en todos los casos. La dosis media de piridostigmina fue 4,8 mg/kg/día en población pediátrica (rango: 3,6-7,2 mg/kg/día) y 260 mg/día en adultos (rango: 120-360 mg/día), divididos en 3-5 dosis diarias. En tres de los pacientes adultos se añadió 3,4-DAP. Se inició tratamiento a 55 mg/día, dividido en 3-5 dosis diarias. En todos los casos se produjo una mejoría clínica que permitió reducir la dosis de piridostigmina. No se comunicó la

existencia de ningún efecto adverso significativo. La dosis media de piridostigmina en los pacientes que recibieron tratamiento con 3,4-DAP fue 170 mg/día (rango: 60-360 mg/día). El paciente B-V.4 presentó sólo una respuesta parcial tras ser tratado con piridostigmina y 3,4-DAP, por lo que se asoció efedrina. Esta fue posteriormente retirada al no observarse tampoco ningún efecto beneficioso.

V.3.4 CASOS REPRESENTATIVOS DE PACIENTES CON SMC POR MUTACIÓN *CHRNE* 1267DELG EN HOMOCIGOSIS CON UN CURSO CLÍNICO PROGRESIVO Y/O FLUCTUANTE.

Paciente A-VI.28.

Mujer de 19 años que debutó al mes de edad con hipotonía generalizada, dificultades para la succión y oftalmoparesia. Presentó un retraso en la adquisición de los hitos motores, con adquisición de la capacidad para la deambulación autónoma a los 24 meses. El curso de la enfermedad se caracterizó por la estabilidad hasta los 18 años de edad, presentando ptosis, oftalmoparesia, debilidad facial, discreta debilidad a nivel proximal y una ligera escoliosis. La sintomatología empeoró significativamente a los 18 años en relación con su primer embarazo, con un empeoramiento clínico aún mayor tras el parto. La paciente era capaz de caminar más de 500 metros antes del embarazo y después del parto no era capaz de caminar más de 100 metros. Presentó una mejoría progresiva seis meses después del parto, pero no había recuperado su estado funcional tras un periodo de 12 meses tras el parto. En otros pacientes con SMC ya había sido descrito previamente la existencia de un empeoramiento en relación con el embarazo, siendo en ocasiones de carácter irreversible [Servais *et al.*, 2013].

Paciente B-V.1.

Varón de 30 años con debut durante el periodo neonatal en forma de hipotonía neonatal, distrés respiratorio, oftalmoplejia y dificultades para la succión. El curso de su enfermedad se ha venido caracterizando por las fluctuaciones y, de hecho, puede ser considerado como un caso paradigmático de la presencia de los periodos de empeoramiento que se producen en los pacientes con SMC. Este paciente presentaba de forma permanente ptosis, debilidad facial, debilidad de predominio proximal y fatigabilidad (era capaz de mantener las extremidades superiores elevadas en un ángulo de 90° durante sólo treinta segundos y precisaba de apoyos para subir las escaleras). Durante su vida ha presentado varios momentos en los que la clínica se ha exacerbado, con posteriores recuperaciones. Durante los periodos de empeoramiento presenta mayor sintomatología oculomotora, deglutoria y un aumento de la debilidad. En algunos de los periodos de mayor afectación, llegó a perder la capacidad para la deambulación autónoma, requiriendo del empleo de una silla de ruedas durante 2 años, entre los 21 y los 23 años de edad. Algunos de los periodos de empeoramiento fueron asociados a infecciones, pero en la mayoría de los casos no se asoció ningún desencadenante.

Paciente B-V.4.

Mujer de 32 años diagnosticada de SMC a los 6 años. Presentó un empeoramiento significativo a los 10 años, con progresión de la fatigabilidad y debilidad. Actualmente, a pesar del tratamiento con piridostigmina y 3,4-DAP, no es capaz de caminar más de 10 metros, por lo que requiere del uso de silla de ruedas para los desplazamientos. Las mencionadas fatigabilidad y debilidad también afectan a las extremidades superiores, por lo que no puede elevar los brazos a 90° durante más de 4 segundos.

V.4 ESTUDIO 4: MIOPATÍA NEMALÍNICA POR *KLHL40* CON UNA RESPUESTA POSITIVA Y MANTENIDA A TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTICOLINESTERÁSICOS.

Presentamos el caso de la segunda hija de una pareja sana no consanguínea de origen filipino. No existen antecedentes familiares de interés. No presenta otros familiares con sintomatología similar o abortos. Los estudios ecográficos prenatales mostraron la presencia de polihidramnios y una reducción de los movimientos fetales. La niña nació a las 39 semanas de edad gestacional con un peso de 2775 gramos (p14, - 1.1 DE), una talla de 46 cm (p2, - 2.07 DE) y un perímetro cefálico de 34 cm (p44, - 0.17 DE). El test de Apgar al nacimiento fue 8/9/9. la paciente mostraba una marcada hipotonía generalizada, estridor congénito, llanto débil, y dificultad respiratoria que requirió de intubación orotraqueal y ventilación con bolsa-mascarilla durante varios minutos después del parto. Requirió ingreso en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCI-N). Requirió soporte respiratorio con presión positiva durante las primeras 48 horas de vida. En la exploración neurológica se objetivó la presencia de debilidad muscular generalizada de predominio distal, ausencia de reflejos osteotendinosos y una facies miopática sin ptosis u oftalmoplejía. Fue dada de alta de la UCI-N después de siete días y permaneció hospitalizada durante dos meses debido a dificultades de succión e hipotonía. Presentó dificultades para la alimentación desde el periodo neonatal precisando de alimentación mediante sonda nasogástrica hasta los tres meses de edad. Los estudios de laboratorio de rutina, incluyendo estudios metabólicos en sangre y orina, fueron normales. El cariotipo fue 46, XX y se descartó la existencia de un síndrome de Prader-Willi. Se realizó resonancia magnética cerebral y medular, sin encontrar ninguna alteración. Los estudios electromiográficos realizados a los tres meses de edad en músculos proximales (deltoides) y distales (abductor pollicis brevis

y/o abductor digiti minimi) mostraron características miopáticas. Los estudios de conducción nerviosa periférica fueron normales. La estimulación nerviosa repetitiva en músculos distales a 3 y 50 Hz no mostró una respuesta decremental. Los niveles de creatinquinasa estaban dentro del rango de la normalidad. La paciente requirió repetidos ingresos hospitalarios por neumonías de aspiración recurrentes durante su primer año de vida, a pesar de la realización de una gastrostomía a los 11 meses de edad. A los 12 meses requirió ingreso en UCI-N por insuficiencia respiratoria en el contexto de una infección. En ese momento pesaba 4,2 kilogramos. Presentaba escasos movimientos espontáneos, el control cefálico todavía no había sido adquirido y los reflejos osteotendinosos profundos estaban ausentes. A la exploración neurológica se objetivó una marcada hipotonía, debilidad generalizada y una facies miopática, sin ptosis ni oftalmoplejía (Figura 1 de la publicación original. Anexo 3).

Como diagnósticos más probables se plantearon los de miopatía congénita y síndrome miasténico congénito. En la biopsia muscular de biceps brachii se identificó una variabilidad del tamaño de las fibras, presencia de algunas fibras redondeadas y pequeñas y un predominio de fibras tipo I, sin otros hallazgos anatomopatológicos específicos. Dado que la principal sospecha diagnóstica fue la de un síndrome miasténico congénito, se inició tratamiento con piridostigmina a una dosis de 30 mg tres veces al día, lo que equivalía a 20 mg/kg/día. Tras tres días de tratamiento, se observó una llamativa respuesta beneficiosa a nivel de capacidad respiratoria. Tras dos semanas de tratamiento la respuesta era franca: había un evidente aumento de los movimientos espontáneos y una mayor expresividad facial. Tras cuatro semanas de tratamiento había adquirido el control cefálico (Figura 2 de la publicación original. Anexo 3) y después de dos meses era capaz de mantener la sedestación sin apoyos. Adquirió la deambulación

con apoyos 6 meses después del inicio del tratamiento (Video como material complementario de la publicación original. Anexo 3). La paciente fue capaz de caminar sin apoyos dieciocho meses después del inicio del tratamiento, a los 2,5 años de edad (Video como material complementario de la publicación original. Anexo 3). Al observar esta llamativa respuesta positiva al tratamiento con piridostigmina, que orientaba hacia la presencia de una enfermedad que afectara a la placa motora, se solicitaron estudios genéticos buscando alteraciones genéticas en los genes implicados en los SMC. En los estudios genéticos realizados se encontraron dos variantes missense en heterocigosis en el gen *DOK7*: c.134C< T (p.Ser45Leu) y c.1406C< A (p.Pro469His). Los anticuerpos anti receptor de acetilcolina y anti MusK fueron negativos.

Esas variantes fueron consideradas como patogénicas en aquel momento y por tanto se consideró que la paciente padecía un SMC por mutaciones en *DOK7*, llegando a publicarse su caso dentro de la primera serie de pacientes con SMC por mutaciones en *DOK7*, publicada por Müller *et al.* en 2007 [Müller *et al.*, 2007], cuando la paciente tenía dos años de edad.

Dada la respuesta favorable, se mantuvo tratamiento con anticolinesterásicos a 20 mg/kg/día. A los 5,5 años se añadió efedrina 30 mg cada 24 horas (2 mg/kg/día), ya que es el tratamiento de primera línea en pacientes con SMC por mutaciones en *DOK7* [Schara *et al.*, 2009; Lashley *et al.*, 2010]. La familia refería una mejoría en la capacidad para caminar distancias largas y una disminución en el tiempo que necesitaba para levantarse del suelo. A pesar de que existe en torno a un 10% de pacientes con SMC por mutaciones en *DOK7* en los que existe una respuesta inicial a anticolinesterásicos, este efecto desaparece a las pocas semanas [Ben Ammar *et al.*,

2010; Klein *et al.*, 2014; Schara *et al.*, 2009; Lashley *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2007]. Dado que la respuesta en la paciente que presentamos era mucho mayor y mantenida en el tiempo que lo reportado en la literatura, se revisó la biopsia muscular. En esta segunda ocasión, en una sección diferente del músculo, se objetivó la presencia de bastones nemalínicos teñidos de rojo agrupados en la periferia y en el centro de la fibra muscular (Figura 3 de la publicación original. Anexo 3). Estos hallazgos eran compatibles con una miopatía congénita con cuerpos nemalínicos, confirmándose posteriormente a través de la microscopía electrónica, donde se observaron bastones nemalínicos electrodensos en las miofibrillas. Teniendo en cuenta los nuevos hallazgos, se solicitó un panel dirigido para miopatías congénitas y síndromes miasténicos congénitos, encontrándose dos mutaciones en el gen *KLHL40* en heterocigosis: una delección c.604delG en el exón 1 que produce una mutación frameshift (p.Ala202Argfs*56) y una mutación missense c.1513G<C (p.Ala505Pro) en el exón 4. Ninguna de estas variantes había sido reportada previamente en Leiden Muscular Dystrophy database (www.dmd.nl) y ambos estaban ausentes en una población control de 1200000 (Exac, www.exac.broadinstitute.org). La variante missense fue considerada como patogénica en todas las aplicaciones *in silico* empleadas (Mutation Taster, www.mutationtaster.org; UMD-Predictor, www.umd-predictor.eu; SIFT, www.provean.jcvi.org y PolyPhen-2, www.genetics.bwh.harvard.edu). Ambos padres eran portadores de una de las mutaciones en heterocigosis: la madre portaba la variante c.604delG en heterocigosis y el padre portaba la variante c.1513G<C (p.Ala505Pro). Además, en los últimos años se ha venido cuestionando la patogenicidad de la variante c.134C<T (p.Ser45Leu) y actualmente se considera muy probable que se trate de un polimorfismo benigno de *DOK7*. Cossins *et al.* sugiere que se trata de una variante no patogénica basándose en estudios funcionales, en su presencia en pacientes con un

diagnóstico genético alternativo y por su frecuencia en la población general [Cossins *et al.*, 2012]. Creemos que la patogenicidad de esta variante c.134C< T (p.Ser45Leu) debe ser reevaluada y que quizá debería ser reclasificada como no patogénica.

Dado el diagnóstico definitivo de miopatía nemalínica en relación con mutaciones en *KLHL40*, se trató de suspender tratamiento con piridostigmina, produciéndose un marcado empeoramiento de la sintomatología, incluyendo debilidad, capacidad de deambulación y dificultades para la deglución. Por ello se ha mantenido el tratamiento con piridostigmina y efedrina. Actualmente la paciente tiene 9 años y pesa 18 kg (Figura 4 de la publicación original. Anexo 3). Recibe tratamiento con piridostigmina (120 mg tres veces al día, correspondiente a 20 mg/kg/día) y efedrina (50 mg una vez al día. 2.8 mg/kg/día). No ha presentado ningún efecto adverso. Actualmente presenta una debilidad más marcada que la fatigabilidad, con un patrón generalizado que incluye musculatura facial y distal de las cuatro extremidades. Presenta una facies miopática, sin ptosis ni limitación de los movimientos oculares. La debilidad facial es más evidente cuando sonríe, con incapacidad para soplar. No se ha objetivado progresión de la debilidad. La debilidad muscular es simétrica con una fuerza de acuerdo con la escala MRC: deltoides, bíceps y tríceps 4+/5; iliopsoas, glúteo y musculatura distal de las cuatro extremidades 4/5. Flexores y extensores del cuello 3/5. Existe una mínima debilidad a nivel de cuádriceps y aductores 5- /5. No se apreció fatigabilidad muscular. La repetición en 10 prensiones palmares sucesivas a la máxima presión no demostró una diferencia entre el primer y el décimo intento. Para tratar de medir la fatigabilidad con mayor precisión en los diversos grupos musculares, se empleó la escala cuantitativa para la miastenia gravis (QMG) (Tabla 1 de la publicación original. Anexo 3). Las puntuaciones para diplopía, ptosis, contar y elevación de

extremidades inferiores resultaron normales. En cambio, las puntuaciones para tragar, musculatura facial, elevación cefálica y prensión palmar resultaron notablemente afectadas. Las puntuaciones para la elevación de extremidades superiores estuvieron discretamente por debajo del límite de la normalidad.

Los reflejos osteotendinosos profundos estaban preservados y la paciente es capaz de deambular autónomamente e, incluso, de correr. En el 6MWT es capaz de caminar 530 metros, lo que está dentro de la normalidad para su edad. Se levanta del suelo en menos de 2 segundos, sin observarse signo de Gowers. Para subir escaleras precisa de apoyos. Presenta unas discretas retracciones a nivel de codos. La persistencia de la afectación bulbar es llamativa, con una voz nasal, dificultades para el lenguaje oral y dificultades para tragar que hacen que prefiera alimentarse a través de gastrostomía. Su nivel cognitivo es normal y su rendimiento académico es bueno.

VI DISCUSIÓN

Algunos de los hallazgos mostrados en esta tesis coinciden con otros estudios publicados en la última década. En nuestras investigaciones, de carácter eminentemente clínico, tratamos de definir con precisión el fenotipo de los diversos subtipos de síndromes miasténicos congénitos. Dado que nuestra cohorte es fruto de una colaboración multicéntrica a nivel nacional, el número de pacientes permite analizar las características de los SMC más prevalentes en España. Se detallan con mayor precisión, y de hecho han sido publicados en trabajos independientes, aquellos SMC más prevalentes en nuestro país: SMC por mutaciones en *RAPSN* y por la mutación c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64) en homocigosis en *CHRNE*. Los resultados de las investigaciones presentadas en esta tesis ofrecen algunos hallazgos importantes que ratifican la existencia de ciertas características fenotípicas típicas de los SMC ya descritas previamente y añaden otras que todavía no habían sido publicadas.

Por otro lado, nos aproximamos al estudio de la afectación de placa motora en las miopatías congénitas. Presentamos el primer caso de miopatía congénita por mutaciones en *KLHL40* con una respuesta franca a fármacos anticolinesterásicos. Este hallazgo corrobora las observaciones previas en las que se observa una importante implicación de la unión neuromuscular en algunas miopatías congénitas [Gibbs *et al.*, 2010; Illingworth *et al.*, 2014; Munot *et al.*, 2010; Robb *et al.*, 2011; Rodríguez Cruz *et al.*, 2014b]. Con nuestros hallazgos, se amplía el abanico de miopatías congénitas en las que existe afectación a nivel de la unión neuromuscular.

A continuación, se discute en profundidad los resultados obtenidos enumerados de acuerdo con los objetivos planteados en la tesis.

VI.1 PREVALENCIA DE LOS SMC EN ESPAÑA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS DIVERSOS SUBTIPOS DE SMC.

Los SMC son patologías neuromusculares poco frecuentes debidas a la presencia de alteraciones en alguno de los genes que codifican para proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad de la unión neuromuscular. Hasta el momento se han llevado a cabo escasos estudios epidemiológicos y tras revisar la literatura encontramos pocos estudios que traten de estimar su prevalencia [Aharoni *et al.*, 2016; Mihaylova *et al.*, 2010; Parr *et al.*, 2014]. En nuestro estudio tratamos de estimar la prevalencia de los SMC en España y la frecuencia relativa de los diversos subtipos de esta enfermedad tratable. Para ello recogimos los datos de una serie de pacientes con diagnóstico genético de SMC.

La prevalencia detectada en España de SMC confirmado genéticamente fue de 1,8 casos por millón de habitantes, siendo variable en las diversas regiones. En comparación con la prevalencia detectada en el Reino Unido [Parr *et al.*, 2014], que se sitúa en 9,2 casos por millón de habitantes, encontramos una menor prevalencia en nuestro país. Esta variabilidad en la prevalencia nacional podría estar relacionada con varios factores: 1) menor representación dentro del total de la población de grupos étnicos donde tradicionalmente la consanguinidad ha sido y sigue siendo frecuente. 2) los SMC son poco frecuentes y es posible que los neurólogos, tanto de adultos como infantiles, no reconozcan la enfermedad. Es probable que los pacientes con sintomatología más leve no sean remitidos a unidades de referencia en patología neuromuscular. 3) a pesar del crecimiento exponencial de la solicitud de estudios genéticos en nuestro país, es posible que existan diferencias en cuanto a la accesibilidad

para solicitarlos en las diversas regiones del país. Como ejemplo, sabemos que en muchos de los pacientes con sospecha clínica de SMC no se han podido llegar a estudiar todos los genes descritos hasta el momento. Por lo tanto, es posible que la cifra obtenida de prevalencia de SMC con diagnóstico genético en España sea menor que la prevalencia real de la enfermedad.

Las mutaciones en *CHRNE* son la causa más frecuente de SMC en población española, representando un 26,6% del total de pacientes. Las mutaciones c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64), c.1353insG (p.Asn452Glufs*4) y c.130insG (p.Glu44Glyfs*3) son las más frecuentemente detectadas. Comparándolo con otras poblaciones estudiadas, esta frecuencia relativa es similar a la obtenida en Reino Unido [Parr *et al.*, 2014], menor a la reportada en población del sur de Brasil [Mihaylova *et al.*, 2010] y mayor que la de población israelí [Aharoni *et al.*, 2016].

El segundo gen que presenta mutaciones con mayor frecuencia en los enfermos españoles es *RAPSN*. La mutación fundadora centroeuropea c.264C>A (p.Asn88Lys) es también la más frecuente con diferencia en población española. De acuerdo con nuestros datos parece que el SMC secundario a la existencia de mutaciones en *RAPSN* es relativamente menos frecuente en España que en otros países europeos como Alemania (17,2% frente a 50%, respectivamente) [Mihaylova *et al.*, 2010], aunque es cierto que los datos de Alemania fueron publicados ya hace algunos años cuando no eran conocidos ni estudiados tantos genes como actualmente. En comparación con las frecuencias relativas de los diferentes subtipos de SMC en Reino Unido, encontramos una frecuencia mayor de mutaciones en *GFPT1* y algo menor de *DOK7* en nuestra cohorte de población española.

Es interesante subrayar la presencia de algunas mutaciones relativamente frecuentes en población española: *RAPSN* c.264C>A (p.Asn88Lys), *CHRNE* c.130insG (Glu44Glyfs*3), *CHRNE* c.1353insG (p.Asn542Glu*4), *DOK7* c.1124_1127dup (p.Ala378Serfs*30) y, en particular, *COLQ* c.1289A>C (p.Tyr430Ser). La mutación fundadora en población gitana *CHRNE* c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64) es también frecuente en población española de etnia gitana y debe ser tenida en cuenta puesto que existe un número significativo de población de etnia romaní en nuestro país. En cualquier caso, existe un elevado número de mutaciones esporádicas, por lo que en la mayoría de los casos sigue siendo recomendable el abordaje diagnóstico mediante pruebas de secuenciación.

VI.2 CORRELACIÓN ENTRE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS RESPONSABLES DE LOS DIVERSOS SMC Y EL FENOTIPO CLÍNICO, ELECTROFISIOLÓGICO Y ANATOMOPATOLÓGICO.

Con nuestra serie de pacientes hemos identificado algunas correlaciones genotipo-fenotipo de relevancia para la práctica clínica. Manifestaciones como la ptosis, la clínica bulbar, la oftalmoplejia, la debilidad cervical y la debilidad de cinturas son más frecuentes en algunos subtipos de SMC que en otros, pudiendo servir como signos guía para orientar al clínico hacia el gen donde se localiza el defecto con mayor probabilidad (**Tabla 6**). La edad de inicio, la respuesta al tratamiento y el curso de la enfermedad a largo plazo también varían en función del gen implicado. La fatigabilidad, no podía ser de otro modo, es el signo más frecuente en los pacientes con SMC.

La ptosis es un signo típicamente asociado a la miastenia y de hecho es, junto a la diplopía, el signo de presentación de la miastenia gravis hasta en un 90% de los casos [Grob *et al.*, 2008; Gwathmey *et al.*, 2015]. En la miastenia congénita también es muy frecuente, pero sólo en algunos subtipos. La presencia de ptosis es la norma en los SMC por déficit del receptor de acetilcolina, pero en otros subtipos es la excepción. En ninguno de los pacientes con defectos en la glicosilación de proteínas (*GFPT1* y *GMPPB*) se objetivó la presencia de ptosis. Observamos que los subtipos de SMC que presentan debilidad de cinturas con mayor frecuencia (defectos de la glicosilación de proteínas, *DOK7*, *COLQ*) son los que presentan ptosis con menor frecuencia. Es importante, por tanto, destacar que la ausencia de ptosis no debe descartar en absoluto la presencia de un SMC ya que en las miastenias de origen genético el signo guía debe ser más la fatigabilidad que la clínica ocular, a diferencia de las miastenias autoinmunes. Por otro lado, es importante incluir a los SMC por déficit de receptor de acetilcolina,

como *CHRNE*, en el diagnóstico diferencial de cuadros de miastenia ocular seronegativa.

La oftalmoparesia es prácticamente exclusiva de los pacientes con SMC por *CHRNE* (sólo un paciente de nuestra serie con un subtipo de SMC distinto a *CHRNE* presentó oftalmoparesia mientras que todos los pacientes con mutaciones en *CHRNE* presentaron oftalmoplejia). En caso de encontrar pacientes con oftalmoplejia y otra sintomatología neurológica asociada que no oriente hacia la miastenia (afectación cognitiva, epilepsia, trastornos del movimiento...) debe plantearse el diagnóstico de otras entidades que también cursan con oftalmoplejia, como las enfermedades mitocondriales.

La debilidad cervical es muy frecuente en cualquiera de los subtipos de SMC y puede servir para sospechar el diagnóstico, sobre todo si se asocia con fatigabilidad. Por otro lado, no resulta especialmente útil para orientar hacia el subtipo de SMC que presenta el paciente, ya que la prevalencia de debilidad cervical es similar en los diversos subtipos (entre un 55% y un 86%).

La edad de debut tiene relación con la afectación genética subyacente (**Figura 8**). La edad media de debut en nuestra muestra fue de 4,2 años (rango desde periodo neonatal hasta 40 años. Mediana: periodo neonatal). La edad media de debut en pacientes con mutaciones en *RAPSN* y *CHRNE* fue significativamente menor que en los pacientes con mutaciones en *GFPT1*, *COLQ* y *DOK7* ($p=0.001$). La aparición de los primeros síntomas se produjo en el periodo neonatal en prácticamente todos los pacientes con SMC por *RAPSN*; en los primeros 3 años de vida en los pacientes con

SMC por *CHRNE* y entre la infancia y el inicio de la edad adulta en los SMC por *DOK7*, *GFPT1* y *COLQ*.

El curso de la enfermedad es variable en función del gen implicado (**Figura 9**). En nuestra muestra de pacientes, es frecuente la presencia de exacerbaciones con debilidad e incluso dificultad respiratoria precipitadas por procesos infecciosos o fiebre en los pacientes con SMC por *RAPSN*. Estas exacerbaciones también se observaron en pacientes con SMC por *DOK7* y, menos frecuentemente, en pacientes con SMC por *CHRNE*. En los pacientes con SMC por *GFPT1*, en cambio, se observó una debilidad progresiva en muchos de ellos.

Dentro de los subtipos de SMC más prevalentes (*CHRNE*, *RAPSN*, *COLQ*, *DOK7* y *GFPT1*) se reconocen unos fenotipos relativamente homogéneos para los dos primeros, que exponemos con mayor detenimiento en los puntos VI.4 y VI.5. *CHRNE* se caracteriza por la presencia de ptosis y oftalmoplejia, en la mayoría de los casos con otros signos asociados, pero en ocasiones con afectación exclusivamente ocular. En *RAPSN* es típica la presencia de exacerbaciones periódicas, en forma de dificultad respiratoria en los primeros años de vida y posteriormente en forma de debilidad. Los SMC por *COLQ*, *DOK7* y *GFPT1* tienen en común la presencia constante de debilidad de cinturas que en ocasiones limita la capacidad de deambulación autónoma, sin oftalmoparesia. Para diferenciar unos de otros puede ser útil tener en cuenta otros aspectos: la debilidad facial, la ptosis y la afectación bulbar son absolutamente excepcionales en *GFPT1* y, en cambio, se presenta en aproximadamente la un 25%-50% de pacientes con *DOK7* y *COLQ*. Diferenciar clínicamente un SMC por *COLQ* de uno producido por *DOK7* puede ser difícil y lo más útil es el estudio neurofisiológico:

encontraremos un doble potencial en *COLQ* y no en *DOK7*. Es importante diferenciar estos dos subtipos ya que el tratamiento es diferente y son prevalentes en nuestro país, más aun teniendo en cuenta que existe una mutación fundadora de *COLQ* en población española: c.1289A>C (p.Tyr430Ser).

El fenotipo del SMC por síndrome de canal lento es variable, aunque sí merece la pena subrayar que observamos de forma constante la presencia de debilidad cervical, más prevalente que en las mutaciones de subunidades del receptor de acetilcolina que dan lugar a un déficit de receptores. El patrón de herencia autosómico dominante y el empeoramiento con anticolinesterásicos son claves diagnósticas muy útiles. El tratamiento con fluoxetina da lugar a un beneficio clínico franco.

Las mutaciones en el gen *CHRNA3* dan lugar a un fenotipo de artrogriposis múltiple congénita, también llamado síndrome de Escobar. Este gen codifica la subunidad epsilon del receptor de acetilcolina, expresada exclusivamente durante el periodo neonatal, ya que en las primeras semanas de vida es sustituida fisiológicamente por la subunidad epsilon. De este modo, lo que se produce cuando existe una alteración en *CHRNA3* es una afectación de placa motora exclusivamente durante el periodo prenatal, algo así como una “miastenia prenatal” que se cura fisiológicamente pero que deja unas secuelas por la disminución de movimientos fetales. Clínicamente, los cinco pacientes que presentamos muestran retracciones articulares que en la mayoría de casos han requerido de correcciones quirúrgicas. Además, presentan una atrofia muscular y una ausencia de respuesta a tratamiento. De acuerdo con los datos extraídos de nuestra cohorte, parece que la proporción de pacientes con esta patología en nuestro medio es relativamente alta.

Creemos que nuestro estudio proporciona información útil para la planificación de estudios genéticas en población española con SMC, pudiendo orientar los estudios en base a la prevalencia de las diferentes mutaciones y los síntomas clínicos que presenta el paciente. Las frecuencias relativas de los diferentes subtipos genéticos de SMC son algo diferentes a las encontradas en otros países. La prevalencia mínima de SMC en España es 1.8/1.000.000. Creemos que estos hallazgos podrían ayudar a diseñar servicios de atención médica y a desarrollar algoritmos de diagnóstico más eficientes para estos pacientes con trastornos tratables. El retraso medio desde la aparición de la sintomatología hasta la obtención del diagnóstico genético en nuestra muestra fue de 10,89 años, lo que pone de manifiesto que no siempre es fácil llegar a un diagnóstico genético en estos pacientes.

Aunque, como hemos ido exponiendo, los diversos subtipos de SMC pueden tener fenotipos reconocibles, también es cierto que incluso las mismas mutaciones en el mismo gen pueden estar presentes en pacientes con una variabilidad fenotípica significativa. Las causas de esta heterogeneidad son todavía desconocidas.

En un 40% de los pacientes de nuestra muestra se realizó una biopsia muscular y, en la mayoría, los hallazgos detectados fueron inespecíficos. No es infrecuente encontrar una variabilidad en el tamaño de las fibras o un predominio de fibras tipo I sin otros hallazgos. La excepción son los pacientes con mutaciones en GMPPB donde se observa un patrón distrófico con fibrosis, necrosis y fibras regenerativas. En estos pacientes el hecho de encontrar una reducción de alfa-distroglicano por inmunohistoquímica puede conducir al error diagnóstico.

La presencia de un decremento en el potencial de acción tras estimulación repetitiva a bajas frecuencias es el hallazgo paradigmático en los trastornos de la unión neuromuscular. Sin embargo, en muchos pacientes pediátricos no llega a objetivarse debido a la falta de colaboración por parte del paciente. En adultos, en cambio, si es un hallazgo casi constante en todos los pacientes. En la mayoría de pacientes con mutaciones en *COLQ* o síndrome de canal lento se objetivó un doble potencial ante un estímulo único.

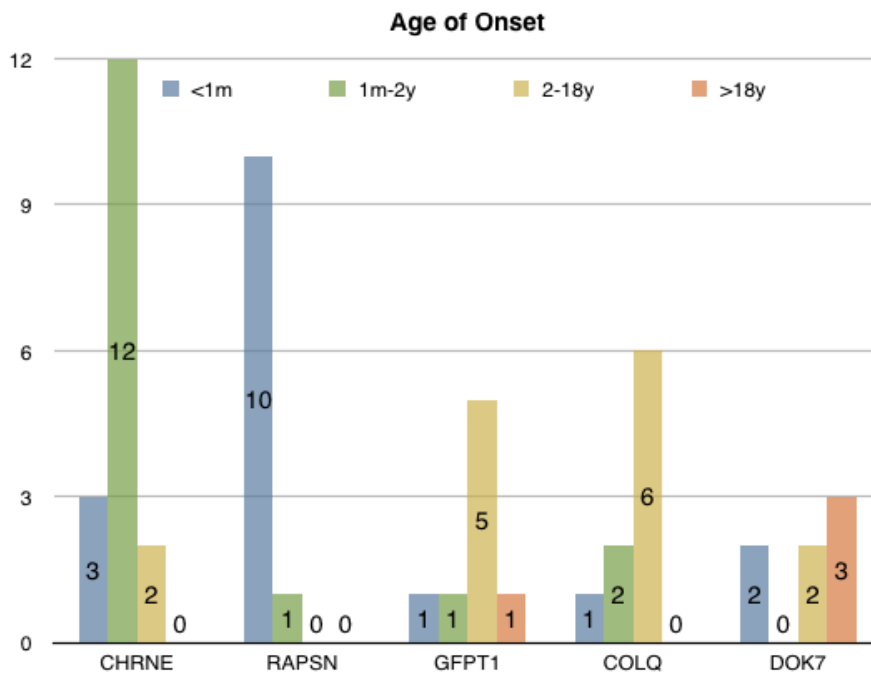


Figura 8. Edad de aparición de la sintomatología en función del gen implicado.

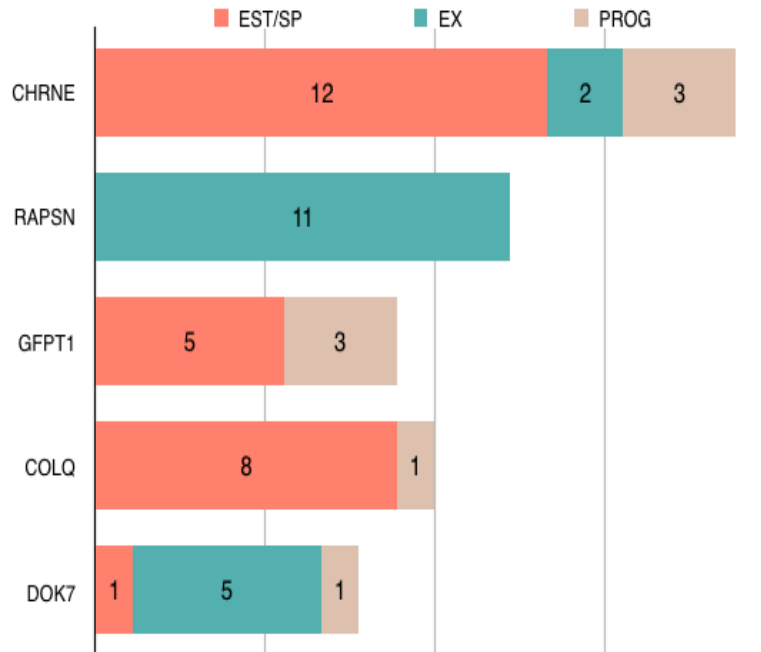


Figura 9. Curso de la enfermedad en función del gen alterado. EX: Exacerbaciones; PROG: Progresiva; EST/LP: Estable o lentamente progresiva

SIGNO	Siempre o muy frecuente (>80%)	Puede presentarse	Nunca o muy excepcional (<10%)
Crisis apnea	<ul style="list-style-type: none"> • <i>RAPSN</i> • <i>CHAT</i> 		<ul style="list-style-type: none"> • <i>CHRNE</i> • <i>COLQ</i> • <i>GFPT1</i> • <i>DOK7</i> • <i>GMPPB</i> • <i>CHRNG</i>
Ptosis	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CHRNE</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>RAPSN</i> • <i>DOK7</i> • <i>COLQ</i> • <i>CHAT</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>GFPT1</i> • <i>GMPPB</i> • <i>CHRNG</i>
Oftalmoplejia/ oftalmoparesia	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CHRNE</i> 		<ul style="list-style-type: none"> • <i>RAPSN</i> • <i>CHRNE</i> • <i>COLQ</i> • <i>GFPT1</i> • <i>DOK7</i> • <i>GMPPB</i> • <i>CHAT</i> • <i>CHRNG</i>
Sintomatología bulbar		<ul style="list-style-type: none"> • <i>RAPSN</i> • <i>CHRNE</i> • <i>COLQ</i> • <i>DOK7</i> • <i>GMPPB</i> • <i>CHAT</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>GFPT1</i> • <i>CHRNG</i>
Debilidad facial		<ul style="list-style-type: none"> • <i>RAPSN</i> • <i>CHRNE</i> • <i>COLQ</i> • <i>DOK7</i> • <i>GMPPB</i> • <i>CHAT</i> • <i>CHRNG</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>GFPT1</i>
Debilidad cervical	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome canal lento • <i>RAPSN</i> • <i>DOK7</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>CHRNE</i> • <i>COLQ</i> • <i>GFPT1</i> • <i>GMPPB</i> • <i>CHAT</i> • <i>CHRNG</i> 	
Debilidad de cinturas	<ul style="list-style-type: none"> • <i>COLQ</i> • <i>GFPT1</i> • <i>DOK7</i> • <i>GMPPB</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>RAPSN</i> • <i>CHRNE</i> • <i>CHAT</i> • <i>CHRNG</i> 	

Tabla 6. Resumen de signos guía y genes más frecuentemente asociados a cada uno de ellos.

VI.3 CORRELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA A LOS DIVERSOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS Y EL DEFECTO GENÉTICO IDENTIFICADO EN LOS DIFERENTES SMC.

La gran mayoría de los pacientes que presentamos reciben actualmente algún tratamiento que ha mejorado su capacidad funcional al disminuir fundamentalmente la debilidad y la fatigabilidad que presentan (véase **Tabla 5**). La respuesta al tratamiento farmacológico es dependiente del subtipo de SMC. Se observó una respuesta beneficiosa tras inicio de tratamiento con piridostigmina en todos los pacientes con mutaciones en *RAPSN*, *CHRNE*, *GFPT1*, *GMPPB* y *CHAT* en los que se probó. En todos los pacientes con mutaciones en *COLQ* en los que se probó tratamiento con piridostigmina se observó un empeoramiento clínico. También hubo una ausencia de respuesta o un empeoramiento en todos aquellos pacientes con SMC por *DOK7* o síndrome de canal lento tratados con anticolinesterásicos.

Reciben tratamiento con algún otro fármaco asociado un 27% de pacientes con mutaciones en *RAPSN* (3/11), un 33% con mutaciones en *CHRNE* (5/15) y un 50% con mutaciones en *GFPT1* (4/8) y *CHAT* (1/2). La mayoría de pacientes que recibieron algún fármaco asociado a piridostigmina fueron tratados con 3,4-DAP (12/13), recibiendo dos de ellos triple terapia con salbutamol o efedrina como tercer fármaco. La respuesta a la asociación de varios fármacos ha sido positiva en todos ellos.

Todos los pacientes con SMC por *COLQ* mostraron una respuesta franca, caracterizada por una disminución de la fatigabilidad y la debilidad, al ser tratados con efedrina. La mayoría de los pacientes con SMC por *DOK7* también mostraron una clara mejoría clínica al ser tratados con efedrina o salbutamol.

Nuestra muestra incluye cuatro pacientes con síndrome de canal lento (pacientes 26, 27, 63 y 64). Antes de alcanzar el diagnóstico genético, todos ellos recibieron tratamiento con piridostigmina. En todos los casos fue retirada por ausencia de respuesta. En los pacientes 26 y 27 se sustituyó por fluoxetina, con una respuesta clínica claramente positiva y persistente en el tiempo ya que actualmente lleva más de 13 años con el tratamiento [Colomer et al. 2006]. En los pacientes 63 y 64 se sustituyó piridostigmina por efedrina y salbutamol, respectivamente, con una respuesta positiva y aparentemente mantenida.

Ninguno de los pacientes con artrogriposis múltiple congénita secundaria a mutaciones en *CHRNG* recibe tratamiento farmacológico actualmente. En uno de ellos se realizó una prueba terapéutica con piridostigmina para evaluar la respuesta de la disfonía y la debilidad facial, sin mostrar ninguna respuesta por lo que el tratamiento fue retirado al cabo de un mes.

VI.4 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, GENÉTICAS, NEUROFISIOLÓGICAS Y DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON UN SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO EN PACIENTES CON SMC CAUSADO POR MUTACIONES EN *RAPSN*.

Presentamos una completa descripción de las características clínicas de diez pacientes con SMC debido a mutaciones en *RAPSN*. Todos los pacientes fueron seguidos durante un período de varios años, permitiendo una evaluación del curso de la enfermedad y su progresión. Gracias al seguimiento a largo plazo de esta cohorte de pacientes hemos podido definir con mayor precisión el fenotipo asociado al SMC por alteraciones en rapsina.

La enfermedad se manifestó en periodo neonatal en todos los casos, con hipotonía y dificultades para la succión. Más de la mitad de los pacientes asoció insuficiencia respiratoria y un 20% presentó artrogriposis. Dos terceras partes presentaron disminución de los movimientos fetales. Estos datos difieren en parte con otros estudios previos en los que se han descrito casos de pacientes con un debut tardío, incluso en la quinta década de vida [Burke *et al.*, 2002; Cossins *et al.*, 2006], pero es similar a otra serie publicada recientemente en la que también existe una elevada proporción de pacientes con un debut precoz [Milone *et al.*, 2009].

Todos nuestros pacientes presentaron ptosis bilateral fluctuante y diplopía intermitente. La diplopía sin oftalmoparesia es infrecuente en los SMC pero, de acuerdo con nuestras observaciones, es muy común en el SMC por *RAPSN*. Por tanto, este puede ser un signo guía para distinguir los SMC debidos a mutaciones en *RAPSN* de los SMC debidos a alteraciones en el receptor de acetilcolina, donde la diplopía suele estar

asociada a oftalmoparesia. Al igual que en estudios previos, la oftalmoparesia constante no es frecuente en el SMC por *RAPSN*. La presencia de debilidad facial, cervical y bulbar es común. La debilidad muscular es mayor a nivel proximal que a nivel distal en todos los pacientes. Estos hallazgos corroboran los de estudios anteriores [Burke *et al.*, 2002; Ohno *et al.*, 2002; Milone *et al.*, 2009; Müller *et al.* 2004a].

El curso clínico es estable durante toda la vida excepto por la presencia de exacerbaciones durante periodos limitados de tiempo. Es importante destacar que todos los pacientes siguieron presentando exacerbaciones, típicamente precipitadas por infecciones menores o fiebre, incluso a pesar del tratamiento farmacológico. Este hallazgo difiere parcialmente con respecto a observaciones previas en las que se consideraba que las exacerbaciones episódicas desaparecían con la edad. La frecuencia y gravedad de las crisis respiratorias tienden a disminuir con la edad, siendo raras después de los 6 años. Por el contrario, durante la adolescencia y edad adulta se siguen presentando marcadas exacerbaciones caracterizadas por debilidad de cinturas, síntomas bulbares y ptosis.

Los pacientes responden claramente al tratamiento con piridostigmina a 5-10 mg/kg/día en niños y 200 mg/día en adultos, divididos en tres a cinco dosis diarias. En la mayoría de los casos no es necesario añadir otros fármacos. Uno de los pacientes que presentamos (paciente 6 en la Tabla 1 de la publicación original. Anexo 1) recibe piridostigmina sólo durante las crisis episódicas o cuando presenta infecciones. Esta modalidad de tratamiento puede ser una posibilidad a valorar en pacientes con sintomatología muy leve. La asociación de 3,4-DAP permitió reducir la dosis de piridostigmina en una cantidad media del 30%.

No todos los pacientes presentaron una respuesta decremental al realizar EMG en el músculo abductor digiti minimi en respuesta a estímulo nervioso. En menos del 50% de los pacientes se objetivó la presencia de decremento. En uno de los pacientes (paciente 10 en la Tabla 1 de la publicación original. Anexo 1) se objetivó una respuesta decremental durante las exacerbaciones, pero no en los “períodos intercrisis”. El hallazgo de este patrón podría ser de utilidad para sospechar la presencia de un defecto de rapsina en otros pacientes. Uno de los pacientes presentó un doble CMAP en respuesta a estímulo único de nervios facial y mediano mientras estaba siendo tratado con piridostigmina y 3,4-DAP. La CMAP repetitiva no es habitual en los pacientes con mutaciones en *RAPSN* y en cambio es frecuente en el síndrome de canal lento y en el SMC por *COLQ*. También puede presentarse en pacientes que están recibiendo tratamiento con anticolinesterásicos. El hallazgo en nuestro paciente parece estar relacionado con la medicación y no creemos que sea un hallazgo relacionado con el SMC por *RAPSN*.

Desde la primera publicación en la que se relacionaba la presencia de mutaciones en *RAPSN* y el SMC [Ohno *et al.*, 2002], se han identificado más de 50 mutaciones patogénicas a lo largo de todo el gen [Banwell *et al.*, 2004; Leshinsky-Silver *et al.*, 2012; Maselli *et al.*, 2007; Müller *et al.* 2004b; Müller *et al.* 2006]. La mutación más prevalente en España es c.264C> A; p.Asn88Lys, al igual que en otras series de pacientes con ascendencia europea publicadas previamente. Tres de las mutaciones encontradas en nuestros pacientes no habían sido publicadas previamente (c.1185delG; p.Thr396Pfs*12, c.869T>C; p.Leu290Pro y c.358delC; p.Gln120Serfs*8). La mutación c.1185delG; p.Thr396Pfs*12 era portada por tres hermanos y otro paciente sin parentesco con ellos. Esto podría indicar una relación familiar lejana o incluso un

efecto fundador en población española. Tanto c.869T>C; p.Leu290Pro como c.358delC; p.Gln120Serfs*8 son portadas por un solo paciente.

Nuestras observaciones indican que las mutaciones en *RAPSN* producen un fenotipo relativamente homogéneo, caracterizado por una respuesta favorable a anticolinesterásicos y la presencia de exacerbaciones con una sintomatología variable en función de la edad del paciente. Presentan, además, ptosis fluctuante, sintomatología bulbar ocasional, debilidad cervical y discreta debilidad proximal. El curso de la enfermedad es estable, excepto por las exacerbaciones intermitentes. La mayoría de los pacientes presentan escasa discapacidad. En la mayoría de los pacientes el tratamiento con 3,4-DAP e inhibidores de colinesterasa da lugar a una respuesta clínica significativa. No encontramos una correlación genotipo-fenotipo evidente.

**VI.5 DESCRIPCIÓN DE LA VARIABILIDAD FENOTÍPICA EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON SMC POR UNA MISMA MUTACIÓN EN *CHRNE*:
c.1327DELG, p.GLU443LYSFS*64**

Presentamos una descripción fenotípica de nueve pacientes con SMC debido a la mutación c.1327delG; p.Glu443Lysfs*64 del gen *CHRNE* en homocigosis. De acuerdo con nuestra revisión, es la primera vez que se presentan en un solo estudio un número tan elevado de pacientes con SMC asociado a una misma mutación. Todos los pacientes fueron seguidos durante un período de varios años permitiendo evaluar el curso de la enfermedad y su progresión. Los hallazgos encontrados nos hacen pensar que el fenotipo ligado a la mutación 1267delG podría ser más heterogéneo de lo que se había descrito anteriormente.

El SMC por mutaciones en *CHRNE* debuta típicamente en los primeros meses de vida. Sin embargo, la presentación clínica de la enfermedad se produjo después de los 6 años de edad en hasta un 25% de nuestros pacientes (Tabla 1 de la publicación original. Anexo 2). Este hallazgo contrasta con lo publicado previamente [Abicht *et al.*, 1999], que consideraba que la aparición de los síntomas se producía en durante el primer año de vida en todos los pacientes.

Tanto la oftalmoparesia como la ptosis simétrica bilateral fueron hallazgos constantes en todos nuestros pacientes, lo que es similar a lo reportado en otras series. Se trata de dos signos útiles, aunque no específicos para orientar la causa del SMC hacia las mutaciones en *CHRNE*. Son frecuentes la debilidad facial y la sintomatología bulbar, que aparecieron aproximadamente en el 78% de nuestros pacientes. Con frecuencia asocian debilidad cervical. El desarrollo motor está dentro de la normalidad,

aunque la edad de adquisición de ciertos hitos motores, como la marcha autónoma, es significativamente mayor en nuestros pacientes que en el resto de la población. Dos tercios de nuestros pacientes presentaban debilidad proximal. Esta debilidad no se observó en ninguno de los tres pacientes pediátricos, pero fue un hallazgo constante en los seis adultos. La debilidad fue moderada o severa en la mitad de estos pacientes y algunos de ellos requirieron el empleo de silla de ruedas de forma permanente o temporalmente coincidiendo con periodos de empeoramiento. Estos datos nos hacen pensar que la debilidad proximal puede ser un signo relativamente frecuente en los adultos con la mutación *CHRNE* c.1327delG; p.Glu443Lysfs*64, incluso aunque no esté presente en las primeras etapas de la vida. Se observó un curso progresivo de la enfermedad hasta en una quinta parte de nuestros pacientes. Aunque el empeoramiento en una enfermedad neurológica como esta podría explicarse por causas no asociadas con la enfermedad como aumento de peso, cambios endocrinológicos, infecciones u otras causas, no tenemos evidencia de que alguno de estos factores estuviera presente.

Ya había sido descrito previamente un empeoramiento clínico durante el embarazo y especialmente en el período postparto. La paciente A-VI.28 (Tabla 1 de la publicación original. Anexo 2), que no había llegado a recuperar la situación clínica que presentaba antes del embarazo, pone de manifiesto el riesgo de que se produzca un empeoramiento clínico durante el embarazo que puede llegar a ser irreversible. De acuerdo con lo encontrado en la bibliografía, la mayoría de las mujeres recupera su situación clínica previa unos seis meses después del parto [Servais *et al.*, 2013].

Encontramos en uno de nuestros pacientes un curso fluctuante, nunca asociado previamente a los SMC por mutaciones en *CHRNE*. El paciente B-V.1 (Tabla 1 de la

publicación original. Anexo 2) presenta un cuadro clínico caracterizado por los empeoramientos y su posterior recuperación. Este tipo de curso clínico fluctuante se había asociado hasta el momento con las mutaciones en *COLQ* y *DOK7* [Mihaylova *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2007], pero no con *CHRNE*.

La respuesta positiva al tratamiento con inhibidores de acetilcolinesterasa fue un hallazgo constante en todos nuestros pacientes, similar a lo observado en publicaciones previas, pero la respuesta no fue completa en todos los casos. La adición de 3,4-DAP supuso una mejoría clínica en todos los pacientes en los que se introdujo y, de hecho, permitió reducir la dosis de piridostigmina.

Esta revisión nos hace plantearnos la posibilidad de que el fenotipo derivado de la presencia de mutaciones en *CHRNE* 1267delG podría no ser tan homogéneo como había sido descrito previamente. Hasta el momento se había considerado esta forma de SMC como benigna, no progresiva y con un bajo impacto en la capacidad de deambulación. Nuestras observaciones indican que esta mutación fundadora en la etnia gitana asocia un fenotipo fundamentalmente caracterizado por la presencia de oftalmoplejía, ptosis bilateral y una buena respuesta a anticolinesterásicos y 3,4-DAP, pero que, además, también asocia con frecuencia debilidad facial, síntomas bulbares, debilidad cervical y debilidad proximal que en ocasiones conduce a una pérdida de la deambulación.

La heterogeneidad fenotípica en estas familias se pone de manifiesto en las diferencias en la edad de inicio (0-9 años), las diferencias en la progresión clínica y la gravedad de la enfermedad. Parece que un amplio espectro de fenotipos puede asociarse

con una sola mutación, incluso en una misma familia. La intensidad de la sintomatología es bastante variable, con pacientes que presentan ptosis y afectación de musculatura extraocular como único síntoma a otros en los que existe presencia de una franca debilidad y fatigabilidad. En cualquier caso, parece que el curso de la enfermedad podría no ser tan benigno como se había pensado previamente, ya que la proporción de pacientes con un curso clínico progresivo o fluctuante es del 33% en nuestra serie. Estos casos amplían el espectro del SMC relacionado con la mutación c.1327delG; p.Glu443Lysfs*64 en homocigosis en *CHRNE*, incluyendo la posibilidad de presentar un curso progresivo, con o sin fluctuaciones. Sería útil que se llevaran a cabo más estudios para tratar de entender las causas de este fenotipo variable. La presencia de mutaciones asociadas, epigenética u otros mecanismos y factores ambientales podrían jugar un papel en la expresión diferente de la enfermedad en individuos con la misma mutación. Se necesitan más estudios para predecir qué pacientes con CMS relacionados con *CHRNE* debido a la mutación 1267delG tendrán un curso estable o progresivo.

VI.6 DESCRIPCIÓN DE PACIENTES CON MIOPATÍA CONGÉNITA CON AFECTACIÓN SECUNDARIA DE LA UNIÓN NEUROMUSCULAR EN LOS QUE EXISTE RESPUESTA FRANCA A ANTICOLINESTERÁSICOS.

La miopatía nemalínica (MN) es una de las miopatías congénitas más frecuentes. Los signos y síntomas más frecuentes son hipotonía, debilidad muscular de predominio proximal, insuficiencia respiratoria y dificultades para la alimentación. La mayoría de los casos presentan un debut neonatal, pero se ha descrito una amplia variabilidad en la edad de inicio y en la gravedad de la enfermedad [Wallgren-Pettersson *et al.*, 2011]. La discapacidad intelectual es poco frecuente. Se acepta que en el mecanismo patogénico de las miopatías nemalínicas tiene una implicación clara la alteración de filamentos finos. La presencia de cuerpos nemalínicos no se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Se considera que la disminución de la contractilidad secundaria a la presencia de defectos primarios en el filamento fino del sarcómero es la causa subyacente de la sintomatología que presentan los pacientes con miopatías nemalínicas [Nance *et al.*, 2012].

Las mutaciones en *KLHL40* (miembro de la familia kelch 40), también conocido como *KBTBD5*, suponen la causa más frecuente de formas graves de MN de acuerdo con algunas series [Ravenscroft *et al.*, 2013]. La clínica presentada por los individuos afectados es grave, incluyendo la presencia de acinesia fetal o hipocinesia, insuficiencia respiratoria y dificultad para deglutir desde el nacimiento. La debilidad suele ser severa y casi la mitad de los individuos no tienen movimientos espontáneos contra la gravedad. Es frecuente que los pacientes asocien retracciones articulares múltiples, fracturas óseas patológicas, dismorfias faciales y deformidades en tórax, columna vertebral, dedos y

pies. La edad media en la que fallecen los pacientes es 5 meses, de acuerdo con algunas series amplias [Kawase *et al.*, 2015; Ravenscroft *et al.*, 2013].

La proteína KLHL40 es esencial para el mantenimiento de la estructura del sarcómero y la contractilidad muscular. Esta proteína está localizada en las bandas I y A del sarcómero y se une a la nebulina (NEB), frecuentemente implicada en MN, y a la lelomodina 3 (LMOD3), una proteína del filamento fino. KLHL40 promueve la estabilidad de NEB y LMOD3. La pérdida de KLHL40 reduce principalmente LMOD3 y esto da lugar a una disrupción del filamento fino, produciendo irregularidades de los discos Z del sarcómero [Garg *et al.*, 2014].

Las características clínico-patológicas de nuestra paciente están en consonancia con el fenotipo descrito en los diecinueve pacientes que habían sido publicados previamente [Ravenscroft *et al.*, 2013] y confirma que las mutaciones en *KLHL40* son una causa frecuente de miopatía nemalínica. A pesar de que la debilidad fue el signo más destacado en nuestra paciente, la ausencia de alteraciones estructurales específicas en la primera revisión de la biopsia muscular y la respuesta clínica beneficiosa tras el tratamiento con piridostigmina orientaron hacia un SMC. Además, el hallazgo de dos variantes en *DOK7* conllevó a diagnosticar a la paciente de un SMC por mutaciones en *DOK7*. La repuesta favorable mantenida tras tratamiento con anticolinesterásicos, no descrita previamente en pacientes con mutaciones en *DOK7*, nos hizo replantearnos el diagnóstico ocho años después de la presentación clínica.

Al revisar la biopsia muscular por segunda vez, se observó la presencia de cuerpos nemalínicos, que no son en absoluto característicos de SMC y que fue la clave

para reorientar el diagnóstico hacia una miopatía congénita. Se alcanzó el diagnóstico definitivo de miopatía por mutaciones en *KLHL40* tras detectar dos mutaciones en heterocigosis. El cuadro clínico asociado a miopatía nemalínica causada por mutaciones en *KLHL40* es típicamente grave. En la exploración neurológica de nuestra paciente no se observaba fatigabilidad (Tabla 1 de publicación original. Anexo 3). Este caso es un buen ejemplo de la necesidad de que las nuevas variantes identificadas en paneles de genética molecular sean evaluadas por clínicos antes de llegar a conclusiones sobre su patogenicidad.

La respuesta mantenida con anticolinesterásicos observada en nuestra paciente es un nuevo hallazgo que no había sido descrito previamente en pacientes con miopatía por mutaciones en *KLHL40*. De acuerdo con lo revisado, no hemos encontrado ningún paciente con este tipo de miopatía en el que se hubiera probado tratamiento con piridostigmina. La mejoría significativa y mantenida en la resistencia y la fuerza de nuestra paciente queda demostrada al observarse una respuesta mantenida durante ocho años. Además, la retirada de la piridostigmina empeoró la sintomatología. El tratamiento combinado con efedrina ofreció una mejoría adicional a la paciente. La respuesta al tratamiento con efedrina en miopatías congénitas no ha sido descrita previamente. La efedrina ha demostrado ser eficaz en algunos pacientes con CMS, pero el mecanismo por el que interviene en la transmisión neuromuscular no está claramente establecido. La asociación de efedrina con anticolinesterásicos puede valorarse en aquellos pacientes con miopatía congénita que ya presentan una buena respuesta a anticolinesterásicos. Cada vez existen más argumentos a favor de la presencia de alteraciones a nivel de transmisión neuromuscular en varios subtipos de miopatía congénita. Informes recientes

En varios tipos de miopatía congénita con anomalías secundarias a nivel de unión neuromuscular se ha sugerido que la debilidad de algunos de estos pacientes podría en parte estar relacionada con defectos en la transmisión neuromuscular [Rodríguez-Cruz *et al.*, 2014b].

En algunos pacientes con miopatías congénitas se había descrito una respuesta beneficiosa tras tratamiento con piridostigmina, pero no en pacientes con miopatías nemalínicas. Sería recomendable que en el futuro se amplíen los estudios para investigar cual es el mecanismo por el que mejoran estas miopatías. Además, se necesitan más estudios para predecir qué pacientes con miopatía congénita tendrán una respuesta beneficiosa tras tratamiento con inhibidores de anticolinesterasa.

VII CONCLUSIONES

- 1) La prevalencia de SMC confirmado genéticamente en España es menor que en otros países donde también ha sido estudiada (Reino Unido, Israel). Es posible que esta cifra aumente en el futuro, cuando la accesibilidad para solicitar estudios genéticos sea mayor.
- 2) El gen más frecuentemente alterado es *CHRNE*; un 26,6% de los pacientes con SMC que residen en España presentan mutaciones en este gen. El segundo gen que presenta mutaciones con mayor frecuencia en los enfermos españoles es *RAPSN*.
- 3) Existen mutaciones frecuentes en población española: *RAPSN* c.264C>A (p.Asn88Lys), *CHRNE* c.130insG (Glu44Glyfs*3), *CHRNE* c.1353insG (p.Asn542Glyfs*4), *DOK7* c.1124_1127dup (p.Ala378Serfs*30) y, en particular, *COLQ* c.1289A>C (p.Tyr430Ser). La mutación *CHRNE* c.1327delG (p.Glu443Lysfs*64) es especialmente frecuente en población española de etnia gitana.
- 4) La presencia de ptosis es la norma en los SMC por déficit del receptor de acetilcolina, pero en otros subtipos es la excepción. En ninguno de los pacientes con defectos en la glicosilación de proteínas (*GFPT1* y *GMPPB*) se objetivó la presencia de ptosis. Los subtipos de SMC que presentan debilidad de cinturas con mayor frecuencia (defectos de la glicosilación de proteínas, *DOK7*, *COLQ*) son los que presentan ptosis con menor frecuencia.
- 5) La oftalmoparesia es prácticamente exclusiva de los pacientes con SMC por *CHRNE*. En pacientes con oftalmoplejia y otra sintomatología neurológica asociada que no oriente hacia la miastenia (afectación cognitiva, epilepsia,

trastornos del movimiento...) debe plantearse el diagnóstico diferencial con otras entidades que también cursan con oftalmoplejia, como las enfermedades mitocondriales.

- 6) La debilidad cervical es muy frecuente en cualquiera de los subtipos de SMC y puede servir para sospechar el diagnóstico, sobre todo si se asocia con fatigabilidad. Por otro lado, no resulta especialmente útil para orientar hacia el subtipo de SMC que presenta el paciente, ya que la prevalencia de debilidad cervical es similar en los diversos subtipos.
- 7) La edad de debut tiene relación con la afectación genética subyacente. La edad media de debut en pacientes con mutaciones en *RAPSN* y *CHRNE* es significativamente menor que en los pacientes con mutaciones en *GFPT1*, *COLQ* y *DOK7*.
- 8) Las mutaciones en *RAPSN* producen un fenotipo relativamente homogéneo, caracterizado por una respuesta favorable a anticolinesterásicos y la presencia de exacerbaciones periódicas, en forma de dificultad respiratoria en los primeros años de vida y posteriormente en forma de debilidad.
- 9) El fenotipo derivado de la presencia de mutaciones en *CHRNE* 1267delG podría no ser tan homogéneo como había sido descrito previamente. Esta mutación fundadora en la etnia gitana asocia un fenotipo fundamentalmente caracterizado por la presencia de oftalmoplejía, ptosis bilateral y una buena respuesta a anticolinesterásicos y 3,4-DAP pero, además, también asocia con frecuencia debilidad facial, síntomas bulbares, debilidad cervical y debilidad proximal que, en ocasiones, conduce a una pérdida de la deambulación.
- 10) Algunas miopatías congénitas asocian alteraciones a nivel de la unión neuromuscular. El caso de una paciente con miopatía nemalínica por mutaciones

CONCLUSIONES

en *KLHL40* y respuesta mantenida al tratamiento con piridostigmina amplía el número de genes relacionados con miopatías congénitas en los que se ha descrito una afectación asociada de la placa motora.

- 11) En ocasiones puede ser difícil diferenciar clínicamente una miopatía congénita de un síndrome miasténico congénito. En estos pacientes debe valorarse la indicación de tratamiento empírico con piridostigmina u otros fármacos empleados en enfermedades de la unión neuromuscular, por el potencial beneficio que puede suponer.
- 12) La gran heterogeneidad clínica y genética de los síndromes miasténicos congénitos hace recomendable el diagnóstico genético para optimizar el tratamiento en cada caso. Un tratamiento inadecuado puede tener graves implicaciones en la calidad de vida de los pacientes.

VIII BIBLIOGRAFÍA

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-después-gene sequencing in diagnostic practice: a study of 680 patients. *Hum Mutat.* 2012; 33:1474-1484.

Abicht A, Müller J S, Lochmüller H. Congenital Myasthenic Syndromes. 2003 May 9 [updated 2016 Jul 14]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Abicht A, Stucka R, Karcagi V, Herczegfalvi A, Horváth R, Mortier W, Schara U, Ramaekers V, Jost W, Brunner J, Janssen G, Seidel U, Schlotter B, Müller-Felber W, Pongratz D, Rüdell R, Lochmüller H. A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology.* 1999; 53:1564-1569.

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; 27:136-140.

Aran A, Segel R, Kaneshige K, Gulsuner S, Renbaum P, Oliphant S, Meirson T, Weinberg-Shukron A, Herschkovitz Y, Zeligson S, Lee MK, Samson AO, Parsons SM, King MC, Levy-Lahad E, Walsh T. Vesicular acetylcholine transporter defect underlies devastating congenital myasthenia syndrome. *Neurology.* 2017; 88:1021-1028.

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; 77:840-850.

Banwell BL, Ohno K, Sieb JP, Engel AG. Novel truncating RAPSN mutations causing congenital myasthenic syndrome responsive to 3,4-diaminopyridine. *Neuromuscul Disord.* 2004; 14:202-207.

Bauché S, O'Regan S, Azuma Y, Laffargue F, McMacken G, Sternberg D, Brochier G, Buon C, Bouzidi N, Topf A, Lacène E, Remerand G, Beaufrere AM, Pebrel-Richard C, Thevenon J, El Chehadeh-Djebbar S, Faivre L, Duffourd Y, Ricci F, Mongini T, Fiorillo C, Astrea G, Burloiu CM, Butoianu N, Sandu C, Servais L, Bonne G, Nelson I, Desguerre I, Nougues MC, Bœuf B, Romero N, Laporte J, Boland A, Lechner D, Deleuze JF, Fontaine B, Strohlic L, Lochmuller H, Eymard B, Mayer M, Nicole S. Impaired Presynaptic High-Affinity Choline Transporter Causes a Congenital Myasthenic Syndrome with Episodic Apnea. *Am J Hum Genet.* 2016; 99(3):753-761.

Beeson D. Congenital myasthenic syndromes: recent advances. *Curr Opin Neurol.* 2016; 29:565-571.

Belaya K, Rodríguez Cruz PM, Liu WW, Maxwell S, McGowan S, Farrugia ME, Petty R, Walls TJ, Sedghi M, Basiri K, Yue WW, Sarkozy A, Bertoli M, Pitt M, Kennett R, Schaefer A, Bushby K, Parton M, Lochmüller H, Palace J, Muntoni F, Beeson D. Mutations in GMPPB cause congenital myasthenic syndrome and bridge myasthenic disorders with dystroglycanopathies. *Brain.* 2015; 138:2493-2504.

Belaya K, Finlayson S, Slater CR, Cossins J, Liu WW, Maxwell S, McGowan SJ, Maslau S, Twigg SR, Walls TJ, Pascual Pascual SI, Palace J, Beeson D. Mutations in DPAGT1 cause a limb-girdle congenital myasthenic syndrome with tubular aggregates. *Am J Hum Genet.* 2012; 91:193-201.

Ben Ammar A, Petit F, Alexandri N, Gaudon K, Bauché S, Rouche A, Gras D, Fournier E, Koenig J, Stojkovic T, Lacour A, Petiot P, Zagnoli F, Viollet L, Pellegrini N, Orlikowski D, Lazaro L, Ferrer X, Stoltenburg G, Paturneau-Jouas M, Hentati F, Fardeau M, Sternberg D, Hantaï D, Richard P, Eymard B. Phenotype genotype analysis in 15 patients presenting a congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *J Neurol.* 2010; 257:754-766.

Bestue-Cardiel M, Sáenz de Cabezón-Alvarez A, Capablo-Liesa JL, López-Pisón J, Peña-Segura JL, Martin-Martinez J, Engel AG. Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency responsive to efedrine. *Neurology.* 2005; 65:144-146.

Burke G, Hiscock A, Klein A, Niks EH, Main M, Manzur AY, Ng J, de Vile C, Muntoni F, Beeson D, Robb S. Salbutamol benefits children with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. *Neuromuscul Disord.* 2013; 23:170-175.

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; 61:826-828.

Carss KJ, Stevens E, Foley AR, Cirak S, Riemersma M, Torelli S, Hoischen A, Willer T, van Scherpenzeel M, Moore SA, Messina S, Bertini E, Bönnemann CG, Abdenur JE, Grosman CM, Kesari A, Punetha J, Quinlivan R, Waddell LB, Young HK, Wraige E, Yau S, Brodd L, Feng L, Sewry C, MacArthur DG, North KN, Hoffman E, Stemple DL, Hurles ME, van Bokhoven H, Campbell KP, Lefeber DJ; UK10K Consortium., Lin YY, Muntoni F.. Mutations in GDP-mannose Pirophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of α -dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2013; 93:29-41.

Chan SH, Wong VC, Engel AG. Neuromuscular junction acetylcholinesterase deficiency responsive to albuterol. *Pediatr Neurol.* 2012; 47:137-140.

Chaouch A, Beeson D, Hantai D, Lochmuller H. 186th ENMC international workshop: congenital myasthenic syndromes 24–26 June 2011, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2012a; 22: 566–576.

Chaouch A, Müller JS, Guergueltecheva V, Dusl M, Schara U, Rakocević-Stojanović V, Lindberg C, Scola RH, Werneck LC, Colomer J, Nascimento A, Vilchez JJ, Muelas N, Argov Z, Abicht A, Lochmüller H. A retrospective clinical study of the treatment of slow-channel congenital myasthenic syndrome. *J Neurol.* 2012b; 259:474-481.

Claeys KG, Maisonobe T, Böhm J, Laporte J, Hezode M, Romero NB, Brochier G, Bitoun M, Carlier RY, Stojkovic T. Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation. *Neurology.* 2010; 74:519-521.

Colomer J, Müller JS, Vernet A, Nascimento A, Pons M, Gonzalez V, Abicht A, Lochmüller H. Long-term improvement of slow-channel congenital myasthenic syndrome with fluoxetine. *Neuromuscul Disord.* 2006; 16:329-333.

Cossins J, Belaya K, Hicks D, Salih MA, Finlayson S, Carboni N, Liu WW, Maxwell S, Zoltowska K, Farsani GT, Laval S, Seidhamed MZ; WGS500 Consortium., Donnelly P, Bentley D, McGowan SJ, Müller J, Palace J, Lochmüller H, Beeson D. Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain*. 2013; 136:944-956.

Cossins J, Liu WW, Belaya K, Maxwell S, Oldridge M, Lester T, Robb S, Beeson D. The spectrum of mutations that underlie the neuromuscular junction synaptopathy in DOK7 congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet*. 2012; 21:3765-3775.

Cossins J, Burke G, Maxwell S, Spearman H, Man S, Kuks J, Vincent A, Palace J, Fuhrer C, Beeson D. Diverse molecular mechanisms involved in AChR deficiency due to rapsyn mutations. *Brain*. 2006; 129:2773-2783.

de la Vaissière S, Toutain A, Chêne MA, Lagrue E, Cantagrel S, Provost S, Eymard B, Castelnau P. Congenital myasthenic syndromes in childhood: Drug therapeutic strategies. *Arch Pediatr*. 2015; 22:724-728.

Dilena R, Abicht A, Sergi P, Comi GP, Di Fonzo A, Chidini G, Natacci F, Barbieri S, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndrome due to choline acetyltransferase mutations in infants: clinical suspicion and comprehensive electrophysiological assessment are important for early diagnosis. *J Child Neurol*. 2014; 29:389-393.

Donger C, Krejci E, Serradell AP, Eymard B, Bon S, Nicole S, Chateau D, Gary F, Fardeau M, Massoulié J, Guicheney P. Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, COLQ, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *Am J Hum Genet*. 1998; 63:967-975.

Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol*. 2015; 14(4):420-434.

Engel AG. Current status of the congenital myasthenic syndromes. *Neuromuscul Disord* 2012a; 22: 99-111.

Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine S. New horizons for congenital myasthenic syndromes. *Ann N Y Acad Sci*. 2012b; 1275:54-62.

Engel AG. The therapy of congenital myasthenic syndromes. *Neurotherapeutics*. 2007; 4:252-257.

Engel AG, Ohno K, Milone M, Wang HL, Nakano S, Bouzat C, Pruitt JN 2nd, Hutchinson DO, Brengman JM, Bren N, Sieb JP, Sine SM. New mutations in acetylcholine receptor subunit genes reveal heterogeneity in the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet*. 1996; 5:1217-1227.

Evangelista T, Hanna M, Lochmüller H. Congenital Myasthenic Syndromes with Predominant Debilidad de cinturas. *J Neuromuscul Dis*. 2015; 2:S21-S29.

Eymard B, Stojkovic T, Sternberg D, Richard P, Nicole S, Fournier E, Béhin A, Laforêt P, Servais L, Romero N, Fardeau M, Hantaï D. Congenital myasthenic syndromes: difficulties in the diagnosis, course and prognosis, and therapy--The French National Congenital Myasthenic Syndrome Network experience. *Rev Neurol (Paris)* 2013; 169:S45-55.

Finlayson S, Beeson D, Palace J. Congenital Myasthenic Syndromes: an update. *Pract Neurol* 2013; 13:80-91.

Forrest K, Mellerio JE, Robb S, Dopping-Hepenstal PJ, McGrath JA, Liu L, Buk SJ, Al-Sarraj S, Wraige E, Jungbluth H. Congenital muscular dystrophy, myasthenic symptoms and epidermolysis bullosa simplex (EBS) associated with mutations in the PLEC1 gene encoding plectin. *Neuromuscul Disord*. 2010; 20:709-711.

Gallenmüller C, Müller-Felber W, Dusl M, Stucka R, Guergueltscheva V, Blaschek A, von der Hagen M, Huebner A, Müller JS, Lochmüller H, Abicht A. Salbutamol-responsive limb-girdle congenital myasthenic syndrome due to a novel missense mutation and heteroallelic deletion in MUSK. *Neuromuscul Disord*. 2014; 24:31-35.

Garg N, Yiannikas C, Hardy TA, Belaya K, Cheung J, Beeson D, Reddel SW. Late presentations of congenital myasthenic syndromes: How many do we miss? *Muscle Nerve* 2016; 54:721-727.

Garg A, O'Rourke J, Long C, Doering J, Ravenscroft G, Bezprozvannaya S, Nelson BR, Beetz N, Li L, Chen S, Laing NG, Grange RW, Bassel-Duby R, Olson EN. KLHL40 deficiency destabilizes thin filament proteins and promotes nemaline myopathy. *J Clin Invest*. 2014; 124:3529-3539.

Gibbs EM, Clarke NF, Rose K, Oates EC, Webster R, Feldman EL, Dowling JJ. Neuromuscular junction abnormalities in DNMT2-related centronuclear myopathy. *J Mol Med (Berl)*. 2013; 91:727-737.

Gomez CM, Maselli R, Gammack J, Lasalde J, Tamamizu S, Cornblath DR, Lehar M, McNamee M, Kuncel RW. A beta-subunit mutation in the acetylcholine receptor channel gate causes severe slow-channel syndrome. *Ann Neurol*. 1996; 39:712-723.

Grob D, Brunner N, Namba T, Pagala M. Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2008; 37:141–149

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; 259:838-850.

Gwathmey KG, Burns TM. Myasthenia Gravis. *Semin Neurol*. 2015; 35:327-339.

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; 86:161-169.

Hantai D, Nicoletta S, and Eymard B. Congenital myasthenic syndromes: an update. *Curr Opin Neurol* 2013, 26:561–568.

Herrmann DN, Horvath R, Sowden JE, Gonzalez M, Sanchez-Mejias A, Guan Z, Whittaker RG, Almodovar JL, Lane M, Bansagi B, Pyle A, Boczonadi V, Lochmüller H, Griffin H, Chinnery PF, Lloyd TE, Littleton JT, Zuchner S. Synaptotagmin 2 mutations cause an autosomal-dominant form of lambert-eaton myasthenic syndrome and nonprogressive motor neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2014; 95:332-339.

Illingworth MA, Main M, Pitt M, Feng L, Sewry CA, Gunny R, Vorstman E, Beeson D, Manzur A, Muntoni F, Robb SA. RYR1-related congenital myopathy with fatigable weakness, responding to Piridostigimine. *Neuromuscul Disord.* 2014; 24:707-712.

Jensen BS, Willer T, Saade DN, Cox MO, Mozaffar T, Scavina M, Stefans VA, Winder TL, Campbell KP, Moore SA, Mathews KD. GMPPB-Associated Dystroglycanopathy: Emerging Common Variants with Phenotype Correlation. *Hum Mutat* 2015; 36:1159-1163.

Kawase K, Nishino I, Sugimoto M, Togawa T, Sugiura T, Kouwaki M, Kibe T, Koyama N, Yokochi K. Nemaline myopathy with KLHL40 mutation presenting as congenital totally locked-in state. *Brain Dev.* 2015; 37:887-890.

Kinali M, Beeson D, Pitt MC, Jungbluth H, Simonds AK, Aloysius A, Cockerill H, Davis T, Palace J, Manzur AY, Jimenez-Mallebrera C, Sewry C, Muntoni F, Robb SA. Congenital myasthenic syndromes in childhood: diagnostic and management challenges. *J Neuroimmunol.* 2008; 201-202:6-12.

Klein A, Robb S, Rushing E, Liu WW, Belaya K, Beeson D. Congenital myasthenic syndrome caused by mutations in DPAGT. *Neuromuscul Disord.* 2015; 25:253-256.

Klein A, Pitt MC, McHugh JC, Niks EH, Sewry CA, Phadke R, Feng L, Manzur AY, Tirupathi S, Devile C, Jayawant S, Finlayson S, Palace J, Muntoni F, Beeson D, Robb SA. DOK7 congenital myasthenic syndrome in childhood: early diagnostic clues in 23 children. *Neuromuscul Disord.* 2013; 23:883-891.

Lashley D, Palace J, Jayawant S, Robb S, Beeson D. Efedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7. *Neurology.* 2010; 74:1517-1523.

Leshinsky-Silver E, Shapira D, Yosovitz K, Ginsberg M, Lerman-Sagie T, Lev D. A novel mutation in the TPR6 domain of the RAPSN gene associated with congenital myasthenic syndrome. *J Neurol Sci.* 2012; 316:112-115.

Liewluck T, Selcen D, Engel AG. Beneficial effects of albuterol in congenital endplate acetylcholinesterase deficiency and Dok-7 myasthenia. *Muscle Nerve.* 2011; 44:789-794.

Logan CV, Cossins J, Rodríguez Cruz PM, Parry DA, Maxwell S, Martínez-Martínez P, Riepsaame J, Abdelhamed ZA, Lake AV, Moran M, Robb S, Chow G, Sewry C, Hopkins PM,

Sheridan E, Jayawant S, Palace J, Johnson CA, Beeson D. Congenital Myasthenic Syndrome Type 19 Is Caused by Mutations in COL13A1, Encoding the Atypical Non-fibrillar Collagen Type XIII α 1 Chain. *Am J Hum Genet.* 2015; 97:878-885.

Maggi L, Brugnani R, Scaioli V, Winden TL, Morandi L, Engel AG, Mantegazza R, Bernasconi P. Marked phenotypic variability in two siblings with congenital myasthenic syndrome due to mutations in MUSK. *J Neurol.* 2013. Epub ahead of print.

Maselli R, Dris H, Schnier J, Cockrell J, Wollmann R. Congenital myasthenic syndrome caused by two non-N88K rapsyn mutations. *Clin Genet.* 2007; 72:63-65.

Mihaylova V, Scola RH, Gervini B, Lorenzoni PJ, Kay CK, Werneck LC, Stucka R, Guerguelcheva 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; 81:973-977.

Mihaylova V, Müller JS, Vilchez JJ, Salih MA, Kabiraj MM, D'Amico A, Bertini E, Wölfle J, Schreiner F, Kurlmann G, Rasic VM, Siskova D, Colomer J, Herczegfalvi A, Fabriciova K, Weschke B, Scola R, Hoellen F, Schara U, Abicht A, Lochmüller H. Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain.* 2008; 131:747-759.

Milone M, Shen XM, Selcen D, Ohno K, Brengman J, Iannaccone ST, Harper CM, Engel AG. Myasthenic syndrome due to defects in rapsyn: Clinical and molecular findings in 39 patients. *Neurology.* 2009; 73:228-235.

Montagnese F, Klupp E, Karampinos DC, Biskup S, Gläser D, Kirschke JS, Schoser B. Two patients with GMPPB mutation: The overlapping phenotypes of limb-girdle myasthenic syndrome and limb-girdle muscular dystrophy dystroglycanopathy. *Muscle Nerve.* 2016 [Epub ahead of print].

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; 130:1497-1506.

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; 67:1159-1164.

Müller JS, Stucka R, Neudecker S, Zierz S, Schmidt C, Huebner A, Lochmüller H, Abicht A. An intronic base alteration of the CHRNE gene leading to a congenital myasthenic syndrome. *Neurology*. 2005; 65:463-465.

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*. 2004a; 41:e104.

Müller JS, Abicht A, Christen HJ, Stucka R, Schara U, Mortier W, Huebner A, Lochmüller H. A newly identified chromosomal microdeletion of the rapsyn gene causes a congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord*. 2004b; 14:744-749.

Munot P, Lashley D, Jungbluth H, Feng L, Pitt M, Robb SA, Palace J, Jayawant S, Kennet R, Beeson D, Cullup T, Abbs S, Laing N, Sewry C, Muntoni F. Congenital fibre type disproportion associated with mutations in the tropomyosin 3 (TPM3) gene mimicking congenital myasthenia. *Neuromuscul Disord*. 2010; 20:796-800.

Nance JR, Dowling JJ, Gibbs EM, Bönnemann CG. Congenital myopathies: an update. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012; 12:165-174.

Ng F, Lee DC, Schrupf LA, Mazurek ME, Lee Lo V, Gill SK, Maselli RA. Effect of 3,4-diaminopyridine at the murine neuromuscular junction. *Muscle Nerve*. 2017; 55:223-231.

O'Connor E, Töpf A, Müller JS, Cox D, Evangelista T, Colomer J, Abicht A, Senderek J, Hasselmann O, Yaramis A, Laval SH, Lochmüller H. Identification of mutations in the MYO9A gene in patients with congenital myasthenic syndrome. *Brain*. 2016; 139:2143-2153.

Ohno K. Is the serum creatine kinase level elevated in congenital myasthenic syndrome? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016; 87:801.

Ohno K, Engel AG. 2004. Lack of founder haplotype for the rapsyn N88K mutation: N88K is an ancient founder mutation or arises from multiple founders. *J Med Genet* 41:e8.

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; 70:875-885.

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.

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; 95:9654-9659.

Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman J, Bouzatt C, Sinet SM, Engel AG. Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged Acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the ϵ subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92:758-762.

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

Palace J, Lashley D, Bailey S, Jayawant S, Carr A, McConville J, Robb S, Beeson D. Clinical features in a series of fast channel congenital myasthenia syndrome. *Neuromuscul Disord.* 2012b; 22:112-117.

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; 99:539-542.

Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG. Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet.* 2013; 93:6-18.

Richard P, Gaudon K, Haddad H, Ammar AB, Genin E, Bauché S, Paturneau-Jouas M, Müller JS, Lochmüller H, Grid D, Hamri A, Nouioua S, Tazir M, Mayer M, Desnuelle C, Barois A, Chabrol B, Pouget J, Koenig J, Gouider-Khouja N, Hentati F, Eymard B, Hantaï D. The CHRNE 1293insG founder mutation is a frequent cause of congenital myasthenia in North Africa. *Neurology*. 2008; 71:1967-1972.

Richard P, Gaudon K, Fournier E, Jackson C, Bauché S, Haddad H, Koenig J, Echenne B, Hantaï D, Eymard B. A synonymous CHRNE mutation responsible for an aberrant splicing leading to congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord*. 2007; 17:409-414.

Robb SA, Sewry CA, Dowling JJ, Feng L, Cullup T, Lillis S, Abbs S, Lees MM, Laporte J, Manzur AY, Knight RK, Mills KR, Pike MG, Kress W, Beeson D, Jungbluth H, Pitt MC, Muntoni F. Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies. *Neuromuscul Disord*. 2011; 21:379-386.

Rodríguez Cruz PM, Belaya K, Basiri K, Sedghi M, Farrugia ME, Holton JL, Liu WW, Maxwell S, Petty R, Walls TJ, Kennett R, Pitt M, Sarkozy A, Parton M, Lochmüller H, Muntoni F, Palace J, Beeson D. Clinical features of the myasthenic syndrome arising from mutations in GMPPB. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016; 87:802-809.

Rodríguez Cruz PM, Palace J, Ramjattan H, Jayawant S, Robb SA, Beeson D. Salbutamol and Efedrine in the treatment of severe AChR deficiency syndromes. *Neurology*. 2015; 85:1043-1047.

Rodríguez Cruz PM, Palace J, Beeson D. Congenital myasthenic syndromes and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol* 2014a; 27:566-575.

Rodríguez Cruz PM, Sewry C, Beeson D, Jayawant S, Squier W, McWilliam R, Palace J. Congenital myopathies with secondary neuromuscular transmission defects; a case report and review of the literature. *Neuromuscul Disord*. 2014b; 24:1103-1110.

Schara U, Della Marina A, Abicht A. Congenital myasthenic syndromes: current diagnostic and therapeutic approaches. *Neuropediatrics* 2012; 43:184-193.

Schara U, Christen HJ, Durmus H, Hietala M, Krabetz K, Rodolico C, Schreiber G, Topaloglu H, Talim B, Voss W, Pihko H, Abicht A, Müller JS, Lochmüller H. Long-term follow-up in

patients with congenital myasthenic syndrome due to CHAT mutations. *Eur J Paediatr Neurol*. 2010; 14:326-33.

Schara U, Barisic N, Deschauer M, Lindberg C, Straub V, Strigl-Pill N, Wendt M, Abicht A, Müller JS, Lochmüller H. Efedrine therapy in eight patients with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. *Neuromuscul Disord*. 2009; 19:828-832.

Schara U, Lochmüller H. Therapeutic strategies in congenital myasthenic syndromes. *Neurotherapeutics*. 2008; 5:542-547.

Selcen D, Ohkawara B, Shen XM, McEvoy K, Ohno K, Engel AG. Impaired Synaptic Development, Maintenance, and Neuromuscular Transmission in LRP4-Related Myasthenia. *JAMA Neurol*. 2015; 72:889-896.

Selcen D, Shen XM, Milone M, Brengman J, Ohno K, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG. GFPT1-myasthenia: clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity. *Neurology*. 2013; 81:370-378.

Senderek J, Müller JS, Dusl M, Strom TM, Guergueltcheva V, Diepolder I, Laval SH, Maxwell S, Cossins J, Krause S, Muelas N, Vilchez JJ, Colomer J, Mallebrera CJ, Nascimento A, Nafissi S, Kariminejad A, Nilipour Y, Bozorgmehr B, Najmabadi H, Rodolico C, Sieb JP, Steinlein OK, Schlotter B, Schoser B, Kirschner J, Herrmann R, Voit T, Oldfors A, Lindbergh C, Urtizberea A, von der Hagen M, Hübner A, Palace J, Bushby K, Straub V, Beeson D, Abicht A, Lochmüller H. Hexosamine biosynthetic pathway mutations cause neuromuscular transmission defect. *Am J Hum Genet*. 2011; 88:162-172.

Servais L, Baudoin H, Zehrouni K, Richard P, Sternberg D, Fournier E, Eymard B, Stojkovic T. Pregnancy in congenital myasthenic syndrome. *J Neurol*. 2013; 260:815-819.

Shen XM, Crawford TO, Brengman J, Acsadi G, Iannacone S, Karaca E, Khoury C, Mah JK, Edvardson S, Bajzer Z, Rodgers D, Engel AG. Functional consequences and structural interpretation of mutations of human choline acetyltransferase. *Hum Mutat*. 2011; 32:1259-1267.

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; 100:7377-7382.

Visser AC, Laughlin RS, Litchy WJ, Benarroch EE, Milone M. Rapsyn congenital myasthenic syndrome worsened by fluoxetine. *Muscle Nerve*. 2017; 55:131-135.

Verschuuren J, Strijbos E, Vincent A. Neuromuscular junction disorders. *Handb Clin Neurol*. 2016; 133:447-466.

Wallgren-Pettersson C, Sewry CA, Nowak KJ, Laing NG. Nemaline myopathies. *Semin Pediatr Neurol*. 2011; 18:230-388.

Webster R, Liu WW, 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; 24:143-147.

Whittaker RG, Herrmann DN, Bansagi B, Hasan BA, Lofra RM, Logigian EL, Sowden JE, Almodovar JL, Littleton JT, Zuchner S, Horvath R, Lochmüller H. Electrophysiologic features of SYT2 mutations causing a treatable neuromuscular syndrome. *Neurology*. 2015; 85:1964-1971.

Witting N, Vissing J. Pharmacologic treatment of downstream of tyrosine kinase 7 congenital myasthenic syndrome. *JAMA Neurol*. 2014; 71:350-354.

Zaharieva IT, Thor MG, Oates EC, van Karnebeek C, Hendson G, Blom E, Witting N, Rasmussen M, Gabbett MT, Ravenscroft G, Sframeli M, Suetterlin K, Sarkozy A, D'Argenzio L, Hartley L, Matthews E, Pitt M, Vissing J, Ballegaard M, Krarup C, Slørdahl A, Halvorsen H, Ye XC, Zhang LH, Løkken N, Werlauff U, Abdelsayed M, Davis MR, Feng L, Phadke R, Sewry CA, Morgan JE, Laing NG, Vallance H, Ruben P, Hanna MG, Lewis S, Kamsteeg EJ, Männikkö R, Muntoni F. Loss-of-function mutations in SCN4A cause severe foetal hypokinesia or 'classical' congenital myopathy. *Brain*. 2016; 139:674-691.

IX PUBLICACIONES ORIGINALES

ANEXO 1

Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic síndrome due to *RAPSN* mutations.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Neuromuscular Disorders ■■ (2015) ■■-■■

www.elsevier.com/locate/nmd

Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic syndrome due to *RAPSN* mutations

D. Natera-de Benito ^{a,*}, M. Bestué ^b, J.J. Vilchez ^c, T. Evangelista ^d, A. Töpf ^d, A. García-Ribes ^e, M.J. Trujillo-Tiebas ^f, M. García-Hoyos ^g, C. Ortez ^h, A. Camacho ⁱ, E. Jiménez ^j, M. Dusl ^k, A. Abicht ^{k,l}, H. Lochmüller ^d, J. Colomer ^{h,1}, A. Nascimento ^{h,1}

^a Department of Pediatrics, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain

^b Department of Neurology, Hospital General San Jorge, Huesca, Spain

^c Department of Neurology, Hospital Universitari La Fe, Valencia, Spain

^d Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE1 3BZ, UK

^e Department of Pediatrics, Hospital Universitario Cruces, Bilbao, Spain

^f Department of Genetics, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^g Department of Genetics, Instituto de Medicina Genómica, Valencia, Spain

^h Department of Neuromuscular Diseases, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

ⁱ Department of Pediatric Neurology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^j Department of Pediatrics, Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Madrid, Spain

^k Friedrich-Baur-Institute, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich 80336, Germany

^l Medical Genetics Center, Munich, Germany

Received 17 June 2015; received in revised form 27 October 2015; accepted 29 October 2015

Abstract

Rapsyn (*RAPSN*) mutations are a common cause of postsynaptic congenital myasthenic syndromes. We present a comprehensive description of the clinical and molecular findings of ten patients with CMS due to mutations in *RAPSN*, mostly with a long-term follow-up. Two patients were homozygous and eight were heterozygous for the common p.Asn88Lys mutation. In three of the heterozygous patients we have identified three novel mutations (c.869T > C; p.Leu290Pro, c.1185delG; p.Thr396Profs*12, and c.358delC; p.Gln120Serfs*8). In our cohort, the *RAPSN* mutations lead to a relatively homogeneous phenotype, characterized by fluctuating ptosis, occasional bulbar symptoms, neck muscle weakness, and mild proximal muscle weakness with exacerbations precipitated by minor infections. Interestingly, episodic exacerbations continue to occur during adulthood. These were characterized by proximal limb girdle weakness and ptosis, and not so much by respiratory insufficiency after age 6. All patients presented during neonatal period and responded to cholinergic agonists. In most of the affected patients, additional use of 3,4-diaminopyridine resulted in significant clinical benefit. The disease course is stable except for intermittent worsening.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Rapsyn; Congenital myasthenic syndrome; Congenital myasthenia; Neuromuscular junction; Pyridostigmine; 3,4-diaminopyridine

1. Introduction

Congenital myasthenic syndromes (CMS) are a heterogeneous group of genetic disorders, all of which impair neuromuscular transmission. At present, 25 different genes have been identified in association with CMS. These genes code for proteins involved in neuromuscular junction structure or function [1–4]. All CMSs share the clinical feature of fatigable weakness, but age of

onset, presenting symptoms, distribution of weakness, and response to treatment differ depending on the molecular mechanism that results from the genetic defect.

Rapsyn is a 43-kDa postsynaptic protein that binds to the long cytoplasmic loop of the AChR subunits and is essential for clustering and anchoring the AChR in the postsynaptic membrane. Mutations in rapsyn compromise the safety margin of neuromuscular transmission by causing endplate AChR deficiency [5]. Rapsyn is composed of several functionally distinct regions: a myristoylated N-terminal is required for membrane interaction; seven tetratricopeptide repeats are involved in rapsyn self-aggregation and binding to the cytoplasmic portion of the muscle-specific kinase MuSK; the coiled-coil domain

* Corresponding author. Department of Pediatrics, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain. Tel.: 034606058561/034606058561.

E-mail address: daninatera@hotmail.com (D. Natera-de Benito).

¹ Both authors have equal contribution.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2015.10.013>

0960-8966/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

interacts with the cytoplasmic loops of AChR subunits; and the C-terminal domain binds to cytoskeletal protein beta-dystroglycan and thereby links the rapsyn–AChR complex to the cytoskeleton.

Today it is estimated that *RAPSN* mutations account for approximately 14–27% of all CMS patients [3,6]. Mutations in *RAPSN* were first described in recessive forms of CMS by Ohno et al. in 2002 [7].

Two distinct phenotypes are described: an early-onset phenotype that presents at birth or in infancy with arthrogryposis, hypotonia, apnoeic crisis, and feeding difficulties; and a less common late-onset phenotype that presents during childhood, or even in adulthood, with weakness and sometimes wasting of distal upper limb muscles. The response to anticholinesterase medication is good in both phenotypes [8].

We describe the clinical and molecular genetic findings as well as long-term follow-up data of 10 patients with CMS due to *RAPSN* mutations. We also aimed to establish reliable clinical signs which might suggest this specific diagnosis.

2. Patients and methods

Patients with genetically confirmed CMS due to mutations in the *RAPSN* gene followed-up in the departments of Paediatric Neurology and Neurology of six Spanish Centers (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; Hospital San Jorge, Huesca; Hospital de Cruces, Bilbao; Hospital La Fe, Valencia; Hospital 12 de Octubre, Madrid; Hospital Rey Juan Carlos, Madrid) were included.

Patients were systematically assessed every six months for the duration of follow-up. Each patient was reassessed and underwent a detailed clinical examination during the six months prior to the conclusion of this work. None of these patients have been previously reported. The study complies with the ethical guidelines of the institutions involved.

Medical Research Council score (MRC) was used for strength testing. Quantitative myasthenia gravis score (QMG) was used to assess fatigability in different muscle groups, and objectify disease severity. 6-minute walk test (6MWT) was used to measure walking endurance.

Electrophysiological studies including motor and sensory nerve conduction studies were performed in all patients. Repetitive nerve stimulation (RNS) at 3 Hz of proximal (deltoid or trapezius) and distal (abductor pollicis brevis) muscles were performed in all patients.

Muscle biopsy specimens were obtained from 2 patients and processed according to standard histological and histochemical techniques.

Molecular genetic analyses were carried out in all 10 patients and, when available, in their parents and siblings. Genomic DNA was isolated from venous blood samples using a blood DNA extraction kit according to the manufacturer's recommendations (Promega, Mannheim, Germany).

The full coding regions of the *RAPSN* gene were amplified and sequenced by bi-directional Sanger Sequencing by the respective research laboratories. Patients 6, 7 and 8 were subjected to whole exome sequencing. DNA samples were sequenced in deCODE genetics (Iceland) as part of NeurOmics Project, using Illumina Nextera Rapid Capture Expanded Exome (62 Mb).

Alignment and variant caller were done using Burrows Wheeler Aligner and Genome Analysis Tool Kit. Data were analyzed on the proprietary interface Clinical Sequence Analyser. Publicly available databases (LOVD: <http://www.dmd.nl/>; ExAc: <http://exac.broadinstitute.org/> and EVS: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) were interrogated to identify previously reported variants and also to determine the frequency of the novel variants observed. For the missense changes, a batch of in silico software (Polyphen: <http://genetics.bwh.harvard.edu/cgi-bin/ggi/ggi2.cgi>; UMD-Predictor: <http://umd-predictor.eu/analysis.php> and Mutation taster: <http://www.mutationtaster.org/>) were used to assess the deleteriousness of the variants.

3. Results

Ten patients (6 males, 4 females) from 8 unrelated families were followed up serially in our clinics over a mean period of 14.5 years (range from 1 to 28 years).

All patients were Spanish with a Caucasian origin. None of the cases were born from consanguineous marriages. Patients 7, 8 and 9 are siblings. The mean age at the first examination was 6 years (7 of 10 were examined for the first time during neonatal period). The patients were aged between 2–53 years old when they were last reviewed.

Individual clinical features of the ten patients harboring mutations in *RAPSN* are summarized in Table 1. Representative photos of patients are shown in Figs. 1–3.

3.1. Age of onset and clinical phenotype

Symptoms within the first hours of life were presented in all the patients. Decreased fetal movements were reported by 67% of mothers who were asked. Polyhydramnios was not found in any of the cases. Muscle hypotonia and sucking difficulties were consistent signs in all the ten cases. Respiratory insufficiency was reported as an associated presenting symptom in the neonatal period in six of ten cases, and respiratory support was required in four of them. Mechanical ventilation was needed in three. Arthrogryposis was noted in two of the patients.

Delayed motor developmental milestones were rarely observed. Eight of ten patients were able to walk autonomously before the age of 18 months. Mildly delayed acquisition of motor milestones in two patients was probably secondary to other conditions they presented (schizencephaly, middle cerebral artery stroke) and not secondary to CMS.

Repeated clinical examinations revealed a variable bilateral ptosis in all the patients, although in 50% of cases ptosis was undetectable for most of the day. Mild *orbicularis oculi* weakness was identified in only two of the patients. Ophthalmoparesis was observed only in one patient: he showed an inability to obtain full horizontal deviation of the eyes. None of the patients displayed pronounced and fixed ophthalmoplegia. The rest of the patients were apparently able to move their eyes without limitations, but all of them reported intermittent diplopia on attempted lateral gaze. Intermittent strabismus was reported in one. Diplopia and strabismus were partially resolved with medication.

Table 1
Individual clinical symptoms of the 10 patients harboring RAPSN mutations.

Patient no.	Family no.	Sex	Age of onset	Neonatal symptoms	Prenatal symptoms	Delayed motor milestones/ Age at walking	Age at diagnosis	Actual age (years)	Ptosis/ Ophthalmoparesis/ Strabismus/ Subjective diplopia/ Facial weakness/Dysphagia	Proximal weakness/ Distal weakness	Neck muscles weakness/ Scoliosis	Disease course	Exacerbations with infections Actual treatment	Impaired ambulation	Mutation
1	1	F	newborn	Respiratory distress (wMV), hypotonia, poor sucking	No	- / 12 m	1m	6	- / - / + / + / -	+ / -	+ / -	EX +	Pyr	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.264C>A; p.Asn88Lys
2	2	F	newborn	Respiratory distress (woMV), hypotonia, poor sucking	Decreased fetal movements	+ / 24 m	1 m	10	- / - / + / - / -	- / -	+ / -	EX +	Pyr	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.264C>A; p.Asn88Lys
3	3	M	newborn	Respiratory distress (wMV), hypotonia, poor sucking	Decreased fetal movements	+ / 26 m	6 m	6	+ / + / + / + / -	- / -	+ / -	EX +	Pyr	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.869T>C; p.Leu290Pro
4	4	M	newborn	hypotonia, poor sucking	Decreased fetal movements	- / 13 m	4m	4	- / - / + / - / -	- / -	- / -	EX +	Pyr	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.1185delG; p.Thr396Pfs*12
5	5	F	newborn	hypotonia, poor sucking	Decreased fetal movements	- / 14 m	2.2 y	10	- / - / + / - / -	- / -	+ / -	EX +	No treatment	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.280G>A; p.Glu94Lys
6	6	M	newborn	Respiratory distress (woMV), hypotonia, poor sucking	nd	- / 12 m	15 y	43	+ / - / + / - / -	+ / -	+ / -	EX +	Pyr + 3,4-DAP	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.1185delG; p.T396Pfs*12
7	6	M	newborn	hypotonia, poor sucking	nd	- / 15 m	25 y	53	+ / - / + / - / +	+ / -	+ / -	EX +	Pyr	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.1185delG; p.T396Pfs*12
8	6	M	newborn	hypotonia, poor sucking	nd	- / 12 m	20 y	48	+ / - / + / + / +	+ / -	- / -	EX +	Pyr + 3,4-DAP	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.1185delG; p.T396Pfs*12
9	7	M	newborn	Respiratory distress (woMV), hypotonia, poor sucking, retractions	No	- / 13 m	1.5 y	2	- / - / ND / + / -	- / -	+ / -	EX +	Pyr	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.358delC; p.Gln120Serfs*8
10	8	F	newborn	Respiratory distress (wMV), hypotonia, poor sucking, retractions	nd	- / 12 m	7 y	24	+ / - / + / - / -	+ / -	+ / -	EX +	Pyr	No	c.264C>A; p.Asn88Lys c.493G>A; p.Val165Met

+/: yes,present; -: not present; m: month, y: year; Pyr: pyridostigmine; EX: exacerbations. wMV: with mechanical ventilation; woMV: without mechanical ventilation.



Fig. 1. Frontal view of the patient 8 when he was 48 years old, after pyridostigmine and 3,4-diaminopyridine treatment. Note the bilateral ptosis.

Bulbar weakness manifested in four of ten patients as difficulties in chewing or swallowing. In all the four cases it was mild and fluctuating. Involvement of facial muscles was observed in four of ten cases. Proximal muscular weakness was found in five patients; it was mild in four and moderate in one. No significant distal weakness was found in any of the patients. Scoliosis was not found in any of the patients.

Patients responded dramatically to anticholinesterase inhibitors (ACEIs). The mean dosage of pyridostigmine was 7.6 mg/kg/day in the pediatric population (ranging from 4.5 to 10 mg/kg/day) and 200 mg/day in the adults (ranging from 180 to 240 mg/day), taken in three to five divided doses. In most cases, it was used from an early stage (median diagnostic delay: 22 months; mean



Fig. 2. Frontal view of the patient 3 when he was 16 months old, after pyridostigmine treatment. Note the bilateral ptosis and facial weakness.

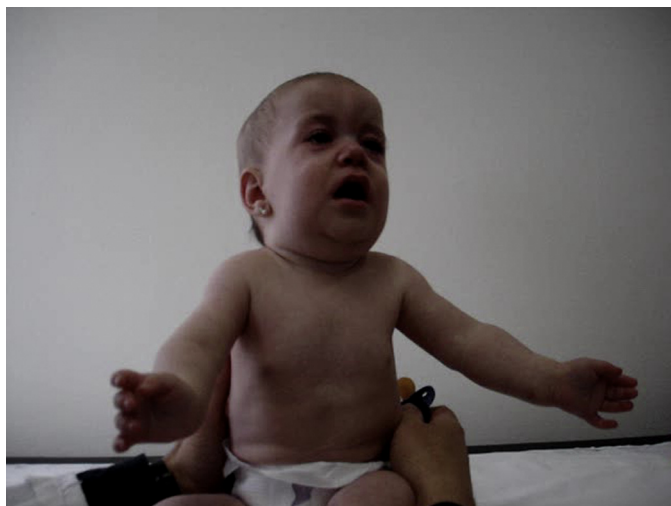


Fig. 3. Frontal view of the patient 1 when she was 7 months old, after pyridostigmine treatment.

diagnostic delay: 42 months). Treatment was started at mean age of 8.9 years (ranged from 2 months to 30 years). Given the favorable clinical response, all patients except one maintain ACEIs treatment. One patient receives pyridostigmine but only during episodic crises. No significant side effects were reported. 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) was added in 3 patients at a mean age of 30 years. It was instituted at 10–20 mg 3 times a day. A remarkable improvement was observed in all three cases, and it allowed a reduction in the dosage of pyridostigmine. 3,4-DAP was subsequently removed in patient 8 due to diarrhea as a side effect. Minor and transient perioral and digital paresthesia was reported in all three patients. Ephedrine was also added in patient 8, but it had to be removed due to urinary incontinence.

Despite treatment, all patients had episodic exacerbations precipitated by minor infections, fever, or no obvious trigger, and 2 cases required ventilatory support during one or more crisis. Although all of them continued to experience episodic exacerbations, these were characterized by proximal limb girdle weakness and ptosis, and to a less extent by respiratory insufficiency after the age of 6 years. Exacerbations tended to decrease in frequency and severity with age.

None of our patients have required nocturnal ventilatory support. Cognitive abilities appeared to be preserved in all the patients. Dysmorphic features were rarely observed: mild high-arched palate was noted in two patients.

To further quantify fatigability in different muscle groups, the QMG outcome instrument was used to assess eight of the patients (Table 2). Scores for diplopia and ptosis were consistently affected in all the patients. Scores for swallowing, head lift, arm raise time, and leg rise time showed an alteration from the limit of normal in at least half of the patients examined. Scores for hand grip, counting, and rise from floor were normal.

All the patients walked a distance within the standard range for age at the 6MWT (Table 2).

The individual clinical data are summarized in Table 1.

Table 2

Quantitative myasthenia gravis score and 6-minute walk test examined in 10 patients harboring *RAPSN* mutations.

	Ratio of patients under lower limit of normal	Mean measuring in our patients	Lower limit of normal in adults
Diplopia	7/7 (100%)	16'94"	60
Ptosis	8/8 (100%)	34'56"	60
Eyelid closure	Mild weakness in 2/8 (25%)	na/nd	Normal
Dysarthria with counting 1–50	0/8 (0%)	None	None
Swallowing 4 oz water	4/8 (50%)	13'11"	
Rise from floor: first time (s)	0/8 (0%)	2'28"	
Right arm held outstretched at 90° (s)	5/7 (71%)	145	240
Left arm held outstretched at 90° (s)	5/7 (71%)	146	240
Head lift 45° supine (s)	4/7 (57%)	75	120
Right leg held outstretched at 45° supine (s)	6/8 (75%)	84'88"	100
Left leg held outstretched at 45° supine (s)	6/8 (75%)	94'62"	100
Repeated sit to stand (number in 1 minute)	0/8 (0%)	28.5	
Rise from floor: second time (s)	0/8 (0%)	3'07"	
6MWT (m)	0/7 (0%)	636	

3.2. Electrophysiological studies

Motor and sensory nerve conduction studies were performed in nine of ten patients and were normal in all. Double compound muscle action potential in response to single nerve stimulus was evident in one of nine patients. He was being treated with pyridostigmine and 3,4-DAP at the time of the study which may have interfered to the result. Electrophysiological studies were performed without medication in the rest of patients. Decremental response following repetitive nerve stimulation was found in four out of nine patients. Electromyography was performed in the same nine patients and revealed myopathic features in four. The individual electrophysiological studies are summarized in Table 3.

3.3. Laboratory studies

AChR antibodies were not detected in any of the patients in whom testing was performed (0/6). The CK level was normal in 10 of 10 individuals. The individual laboratory studies are summarized in Table 3.

3.4. Investigations of muscle biopsy specimens

As the main first suspected diagnosis was a myopathy, two patients underwent muscle biopsy. Variation in fiber size was present in both. Type one fiber predominance was not observed

in either. No biopsy showed tubular aggregates with the panel of histological and histochemical stains applied. The individual muscle biopsies are summarized in Table 3.

3.5. Mutation analysis

Results of the genetic analyses are summarized in Table 1. All patients carried the most well-known pathogenic mutation p.Asn88Lys on at least one allele. Two patients (patients 1 and 2) were homozygous for the recessive mutation c.264C > A; p.Asn88Lys. Eight patients from six families were compound heterozygous for the mutation c.264C > A; p.Asn88Lys and a different *RAPSN* mutation: among them a frameshift mutation in six patients (frameshift mutations: c.1185delG; p.Thr396Pfs*12, and c.358delC; p.Gln120Serfs*8) and a missense mutation in two patients (missense mutations: c.280G > A; p.Glu94Lys, c.493G > A; p.Val165Met, c.869T > C; p.Leu290Pro). The two novel missense variants (p.Val165Met and p.Leu290Pro) were predicted to be possibly or probably pathogenic by in silico prediction tools. Analysis of the parents and other family members, if available, confirmed a segregation of these additional mutations according to autosomal recessive inheritance.

These last three mutations have not been reported in any of the available clinical databases (as of March 2015) and are also absent from the control population. Analysis of the family

Table 3

Complementary investigations of the 10 patients with a *RAPSN* mutation.

Patient	Electrophysiology			Muscle biopsy findings	
	RNS decrement	Double CMAP	Myopathic potentials	Variable fiber size	Type 1 pred/type 2 atrophy
1	-	-	-	+	-
2	nd	nd	nd	nd	nd
3	-	-	+	nd	nd
4	+	-	-	nd	nd
5	-	-	-	nd	nd
6	+	+	+	nd	nd
7	+	-	+	+	-
8	+	-	+	nd	nd
9	-	-	-	nd	nd
10	-	-	-	nd	nd

+: yes, present; -: not present; nd: not done.

members revealed that each of these additional mutations is recessive. Each unaffected parent carried a *RAPSN* mutation on one allele, and the unaffected siblings carried one or no mutation, confirming that the mutations segregated with the disease. The two novel missense variants (p.Val165Met and p.Leu290Pro) were predicted to be pathogenic or probably pathogenic by three different in silico prediction programs.

4. Discussion

Here, we present a comprehensive description of the clinical findings of ten patients with CMS due to mutations in *RAPSN*. Furthermore, all patients were followed over a period of several years allowing longitudinal assessment of disease course and progression. This cohort of patients with a long-term follow-up enabled us to refine the phenotype linked to rapsyn-CMS in Spain. We present two novel missense mutations.

In this subset of rapsyn-CMS patients, the disease manifested at birth in all cases with hypotonia and sucking difficulties. Respiratory insufficiency was associated in more than half of patients and arthrogryposis in 20%. Two thirds had decreased fetal movements. This contrasts with previous reports of onset as late as the fifth decade of life [8,9] but is similar to the high ratio of early onset phenotype noted in another recent series [10].

Fluctuating bilateral ptosis and diplopia were consistent findings in our patients. Diplopia without ophthalmoparesis is rarely reported in CMS but, according to our observations it is very common in rapsyn-CMS. It may be a reliable criterion for distinguishing rapsyn-CMS from CMS caused by low expressor mutations in the AChR subunit, in which the presence of diplopia is usually associated with ophthalmoparesis. As previously observed, constant ophthalmoparesis is not common in rapsyn-CMS. Facial, cervical, and bulbar weakness were common. Proximal muscle weakness was as or more severe than distal weakness in all patients. These findings corroborate those of previous studies [7,8,10,11].

Clinical course is stable throughout life except for intermittent worsening. Importantly, exacerbations typically precipitated by minor infections or fever continued to occur in all patients even despite treatment. This finding contrasts somewhat with previous observations that episodic exacerbations disappear with age. Respiratory crises tend to decrease in frequency and severity with age and after age 6 are rare. On the contrary, marked exacerbations characterized by cervical and proximal limb girdle weakness, bulbar symptoms, and ptosis continue to be observed through childhood, adolescence and adulthood.

Patients respond dramatically to ACEIs. A significant decrease in exacerbation frequency is observed after treatment with pyridostigmine at 5–10 mg/kg/day in children and 200 mg/day in adults, divided into three to five daily doses. In most cases, addition of other drugs is not necessary. Patient 6 receives pyridostigmine only during episodic crises or infections. This treatment regimen may be a possibility to explore in patients with mild symptoms. Addition of 3,4-DAP led to further clinical improvement allowing a mean reduction of 30% in the dosage of pyridostigmine.

Not all patients had a decremental EMG response recording over the abductor digiti minimi muscle in response to single nerve stimulus; this was observed in less than 50%. It is a nonspecific finding in different types of CMS. In patient 10, decremental response was demonstrated during exacerbations but not in the “inter-crisis period”. The finding of this pattern in other patients may point to a defect in rapsyn. A double CMAP in response to single nerve stimulus in facial and median nerves was evident in patient 6, who was being treated with pyridostigmine and 3,4-DAP when electrophysiological studies were performed. Repetitive CMAP is not common in patients with *RAPSN* mutations but it is easily observed in slow-channel syndrome and *COLQ*-CMS. It can also occur after administration of AChE inhibitors. This unexpected finding in our patient may be related to medication therefore, and it is unclear whether it is a feature of rapsyn-related CMS.

Since the discovery that mutations in rapsyn cause a CMS [7], more than 50 mutations dispersed through the entire *RAPSN* gene have been identified [8–22]. c.264C > A; p.Asn88Lys occurs in Spain with high frequency, as observed in other series of patients with European ancestry, which is likely due to a founder effect. Three mutations reported here are novel and family analysis indicates they are recessive. Interestingly, p.Thr396PfsX12 was carried by three siblings and another non-related patient, which may indicate a distant relationship or even a founder mutation in the Spanish population. Both p.L290P and p.Gln120Serfs*8 were carried by only one patient each.

Our observations indicate that rapsyn mutations lead to a quite homogeneous phenotype, further characterized by exacerbations whose symptoms are age-related, and good response to anticholinesterase drugs; but also by fluctuating ptosis, occasional bulbar symptoms, neck muscle weakness, and mild proximal muscle weakness. The disease course is stable except for intermittent worsening. The majority of patients experience little disability. In most of the affected patients, treatment with 3,4-DAP and cholinesterase inhibitors results in significant clinical benefit. We found no obvious genotype-phenotype correlation. Patients with frameshift mutations did not show significantly more severe symptoms and their phenotype was not obviously clinically distinguishable. In our series, heterozygous mutations are not associated with an evidently more severe phenotype than those showed in p.Asn88Lys homozygosity.

Acknowledgements

The first author was partially supported by a SENEP (Spanish Pediatric Neurology Society) fellowship.

H Lochmüller, A Töpf and T Evangelista are supported by the Medical Research Council UK (reference G1002274, grant ID 98482), and by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 305444 (RD-Connect) and 305121 (Neuromics).

The authors thank the patients and family members for their participation in this study.

We also wish to acknowledge the contribution of the co-authors Fiona Blanco Kelly and Camilo Vélez Monsalve.

References

- [1] Engel AG. Current status of the congenital myasthenic syndromes. *Neuromuscul Disord* 2012;22(2):99–111.
- [2] Engel AG. Congenital myasthenic syndromes in 2012. *Curr Neurol Neurosci* 2012;12:92–101.
- [3] Abicht A, Dusl M, Gallenmuller C, et al. Congenital myasthenic syndromes: achievements and limitations of phenotype-guided gene after-gene sequencing in diagnostic practice: a study of 680 patients. *Hum Mutat* 2012;33:1474–84.
- [4] Rodríguez Cruz PM, Palace J, Beeson D. Congenital myasthenic syndromes and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol* 2014;27:566–75.
- [5] Zuber B, Unwin N. Structure and superorganization of acetylcholine receptor–rapsyn complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(26):10622–7.
- [6] Parr JR, Andrew MJ, Finnis M, et al. How common is childhood myasthenia? The UK incidence and prevalence of autoimmune and congenital myasthenia. *Arch Dis Child* 2014;99(6):539–42.
- [7] Ohno K, Engel AG, Shen XM, et al. Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. *Am J Hum Genet* 2002;70:875–85.
- [8] Burke G, Cossins J, Maxwell S, et al. Rapsyn mutations in hereditary myasthenia: distinct early- and late-onset phenotypes. *Neurology* 2003;61:826–8.
- [9] Cossins J, Burke G, Maxwell S, et al. Diverse molecular mechanisms involved in AChR deficiency due to rapsyn mutations. *Brain* 2006;129:2773–83.
- [10] Milone M, Shen XM, Selcen D, et al. Myasthenic syndrome due to defects in rapsyn: clinical and molecular findings in 39 patients. *Neurology* 2009;73(3):228–35.
- [11] Muller JS, Mildner G, Muller-Felber W, et al. Rapsyn N88K is a frequent cause of congenital myasthenic syndromes in European patients. *Neurology* 2003;60:1805–10.
- [12] Ohno K, Sadeh M, Blatt I, Brengman JM, Engel AG. E-box mutations in the RAPSN promoter region in eight cases with congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2003;12:739–48.
- [13] Dunne V, Maselli RA. Identification of pathogenic mutations in the human rapsyn gene. *J Hum Genet* 2003;48:204–7.
- [14] Richard P, Gaudon K, Andreux F, et al. Possible founder effect of rapsyn N88K mutation and identification of novel rapsyn mutations in congenital myasthenic syndromes. *J Med Genet* 2003;40:e81.
- [15] Banwell BL, Ohno K, Sieb JP, Engel AG. Novel truncating RAPSN mutations causing congenital myasthenic syndrome responsive to 3,4-diaminopyridine. *Neuromuscul Disord* 2004;14:202–7.
- [16] Ohno K, Engel AG. Lack of founder haplotype for the rapsyn N88K mutation: N88K is an ancient founder mutation or arises from multiple founders. *J Med Genet* 2004;41:e8.
- [17] Burke G, Cossins J, Maxwell S, et al. Distinct phenotypes of congenital acetylcholine receptor deficiency. *Neuromuscul Disord* 2004;14:356–64.
- [18] Ioos C, Barois A, Richard P, Eymard B, Hantai D, Estournet-Mathiaud B. Congenital myasthenic syndrome due to rapsyn deficiency: three cases with arthrogryposis and bulbar symptoms. *Neuropediatrics* 2004;35:246–9.
- [19] Muller JS, Abicht A, Christen HJ, et al. A newly identified chromosomal microdeletion of the rapsyn gene causes a congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord* 2004;14:744–9.
- [20] Muller JS, Baumeister SK, Rasic VM, et al. Impaired receptor clustering in congenital myasthenic syndrome with novel RAPSN mutations. *Neurology* 2006;67:1159–64.
- [21] Maselli RA, Dris H, Schnier J, Cockrell JL, Wollmann RL. Congenital myasthenic syndrome caused by two non-N88K rapsyn mutations. *Clin Genet* 2007;72:63–5.
- [22] Michalk A, Stricker S, Becker J, et al. Acetylcholine receptor pathway mutations explain various fetal akinesia deformation sequence disorders. *Am J Hum Genet* 2008;82:464–76.

ANEXO 2

Phenotypic heterogeneity in two large Roma families with
a congenital myasthenic syndrome due to *CHRNE*
1267delG mutation. A long-term follow-up.



Phenotypic heterogeneity in two large Roma families with a congenital myasthenic syndrome due to *CHRNE* 1267delG mutation. A long-term follow-up

D. Natera-de Benito ^{a,*}, J. Domínguez-Carral ^b, N. Muelas ^c, A. Nascimento ^d, C. Ortez ^d, T. Jaijo ^c,
R. Arteaga ^b, J. Colomer ^d, J.J. Vilchez ^c

^a Department of Pediatrics, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain

^b Department of Pediatrics, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

^c Department of Neurology, Hospital Universitari La Fe, Valencia, Spain

^d Department of Neuromuscular Diseases, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

Received 21 March 2016; received in revised form 22 July 2016; accepted 10 August 2016

Abstract

Congenital myasthenic syndromes (CMS) are a heterogeneous group of genetic disorders. Mutations in *CHRNE* are one of the most common cause of them and the ϵ 1267delG frameshifting mutation is described to be present on at least one allele of 60% of patients with *CHRNE* mutations. We present a comprehensive description of the heterogeneous clinical features of the CMS caused by the homozygous 1267delG mutation in the AChR ϵ subunit in nine members of two large Gypsy kindreds. Our observations indicate that founder Roma mutation 1267delG leads to a phenotype further characterized by ophthalmoplegia, bilateral ptosis, and good response to pyridostigmine and 3,4-DAP; but also by facial weakness, bulbar symptoms, neck muscle weakness, and proximal limb weakness that sometimes entails the loss of ambulation. Interestingly, we found in our series a remarkable proportion of patients with a progressive or fluctuating course of the disease. This finding is in some contrast with previous idea that considered this form of CMS as benign, non progressive, and with a low impact on the capacity of ambulation.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *CHRNE*; Acetylcholine receptor; Congenital myasthenic syndrome; Congenital myasthenia; Roma gypsies; Neuromuscular junction; Pyridostigmine; 3,4-Diaminopyridine; Founder mutation

1. Introduction

Congenital myasthenic syndromes (CMS) are a heterogeneous group of genetic disorders, all of which impair neuromuscular transmission. To date, more than 20 different genes are known to cause CMS, coding for proteins involved in neuromuscular junction structure and function. CMS are characterized by an impaired neuromuscular signal transduction [1–5].

Acetylcholine receptors (AChR) at neuromuscular junction are pentameric protein complexes composed of 4 subunits in the ratio of 2 alpha subunits to 1 beta, 1 epsilon, and 1 delta subunit. Embryonic acetylcholine receptors contain the gamma subunit in place of the epsilon subunit [6,7]. The transition from

embryonic to adult AChR occurs in neonates during the first 2 weeks after birth [8].

Mutations with a reduced expression of the acetylcholine receptor are predominantly located in the epsilon subunit. Mutations in the gene encoding the AChR ϵ subunit (*CHRNE*; OMIM 608931) have been reported to be the cause of approximately 40–50% of all CMS, although frequencies of mutations can vary considerably between different populations [3]. The main reason for this is that expression of the fetal type γ subunit, although at a low level, partially compensates for absence of the ϵ subunit whereas patients harboring null mutations in subunits other than ϵ might not survive for lack of a substituting subunit [6,9,10]. Mutations in *CHRNE* were first described in recessive forms of CMS by Ohno et al. in 1995 [11]. *CHRNE* is located on 17p13.1 [11]. In approximately 60% of patients with *CHRNE* mutations, the founder ϵ 1267delG mutation is present on at least one allele, depending on series [3,12]. This frameshifting ϵ 1267delG mutation occurring at

* Corresponding author. Department of Pediatrics, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain. Fax: +034 916006413.

E-mail address: daninatera@hotmail.com (D. Natera-de Benito).

homozygosity is endemic in Roma families where it derives from a common founder [13].

Clinical phenotype of CMS due to ϵ 1267delG mutation has been reported to be similar to that of patients with other epsilon subunit mutations [14–16]. A mild clinical heterogeneity has been described. The classic presentation occurs in infancy [12] but there have been patients with other mutations in *CHRNE* and a later onset reported [14]. Most patients develop ophthalmoparesis and bilateral ptosis. Bulbar and proximal limb weaknesses are also common. *CHRNE* ϵ .1267delG patients reported so far showed a mild and non progressive course of the disease. Response to anticholinesterase inhibitors (ACEIs) is favorable but incomplete. Additional use of 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) results in further improvement but the limited ocular ductions, pronounced in most patients with AChR deficiency, are typically refractory to any therapy [1,5,12,14,17].

We here present a series of nine patients of two large unrelated Roma kindreds with a CMS caused by a *CHRNE* 1267delG mutation. Moderately heterogeneous clinical features are observed. Moreover, we report five additional family members with similar symptoms who were not homozygous for this mutation. We discuss the clinical clues that may help to distinguish them.

2. Materials and methods

Fourteen members (10 females, 4 males) from two unrelated kindreds were followed up over a mean period of 9.9 years (range from 1 to 26 years). Patients were systematically assessed every six months for the duration of follow-up. Each of these fourteen clinically affected family members was reassessed and underwent a detailed clinical examination during the six months prior to the conclusion of this work. Written informed consent was obtained from all patients or their legal representatives. The study complies with the ethical guidelines of the institutions involved. None of these patients have been previously reported.

Medical Research Council score (MRC) was used for strength testing. Quantitative myasthenia gravis score (QMG) was used to assess fatigability in different muscle groups, and objectify disease severity.

Electrophysiological studies including electromyography, motor and sensitive nerve conduction and repetitive nerve stimulation (RNS) at 3 Hz of proximal (deltoid or anconeus) and distal (abductor pollicis brevis and/or abductor digiti minimi) muscles were performed.

Molecular genetic analyses were carried out in all 14 patients. Genomic DNA was isolated from venous blood samples using a blood DNA extraction kit according to the manufacturer's recommendations (Promega, Mannheim, Germany). Exon 12 and intronic flanking sequences of the *CHRNE* were PCR amplified with primers 5'-AGAGGCCACCCTGTCTC-3' and 5'-GGCACACACCATTCTTGTGA-3'. PCR-amplified fragments were sequenced using the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems) and the sequences obtained were compared with the consensus sequence NM_000080.3.

Muscle biopsy specimens were obtained from 3 patients (Patients A-VI.28, A-V.7 and A-V.11) and processed according to standard histological and histochemical techniques.

3. Results and representative case histories

We were able to trace 65 and 108 members in six and seven generations of each family, respectively (Fig. 1) and were able to interview and examine fourteen apparently affected family members. All of them were Spanish with a Roma origin and most of them were born from consanguineous marriages. Seven other family members with myasthenic symptoms were not available for the study: two had passed away and five could not be located.

Molecular genetic analyses were performed in all these fourteen individuals with clinical symptoms. Homozygous 1267delG mutation in *CHRNE* was found in nine of them. Six were women and three were men. The mean age at the first examination was 9.6 years old (range from newborn period to 30 years old). They were followed up over a mean period of 11.6 years (range from 1 to 26 years). The patients were 8–34 years old when they were last reviewed. Individual clinical features of the nine index patients homozygous for ϵ 1267delG are summarized in Table 1. A representative photograph is shown in Fig. 2.

3.1. Age of onset and clinical phenotype

Disease onset ranged from first weeks after birth to 9 years (Mean 2.2 years; median 12 months). Arthrogryposis or other antenatal manifestations were not reported in any patient.

Onset in the first month of life was observed in four patients. Hypotonia, poor cry and suck, and ophthalmoparesis were constant signs in all the four cases. Respiratory insufficiency was reported as an associated presenting symptom in the neonatal period in three of them (one of them required respiratory support). Onset of the disease occurred between the ages of 1 and 2 years in three patients with ptosis. In two patients the initial symptoms were noted after 6 years with ptosis or ophthalmoparesis.

Delayed motor development was rarely observed. Seven of nine patients were able to walk autonomously before the age of 18 months. However, the mean and median age of acquisition of gait without support were significantly higher than those of the normal population (mean: 16.4 months, median: 18 months, range: 12–24 months). Ophthalmoparesis and bilateral symmetric ptosis were observed in all nine patients. Facial weakness and mild bulbar symptoms were encountered in seven patients. None of them required a minced or pureed diet.

Proximal muscle weakness was found in six patients. It was mild in three (patients A-VI.28, A-V.7, and A-V.11), moderate in one (patient B-V.5) and severe in two (patients B-V.1 and B-V.4), rendering one patient (patient B-V.4) wheelchair bound at age 12 years, and two others with restricted ambulation, defined as the inability to walk more than 350 meters autonomously. No significant distal weakness was found in any of the patients. Selective involvement of neck flexor muscles was noted in five patients. Scoliosis was found in three patients.

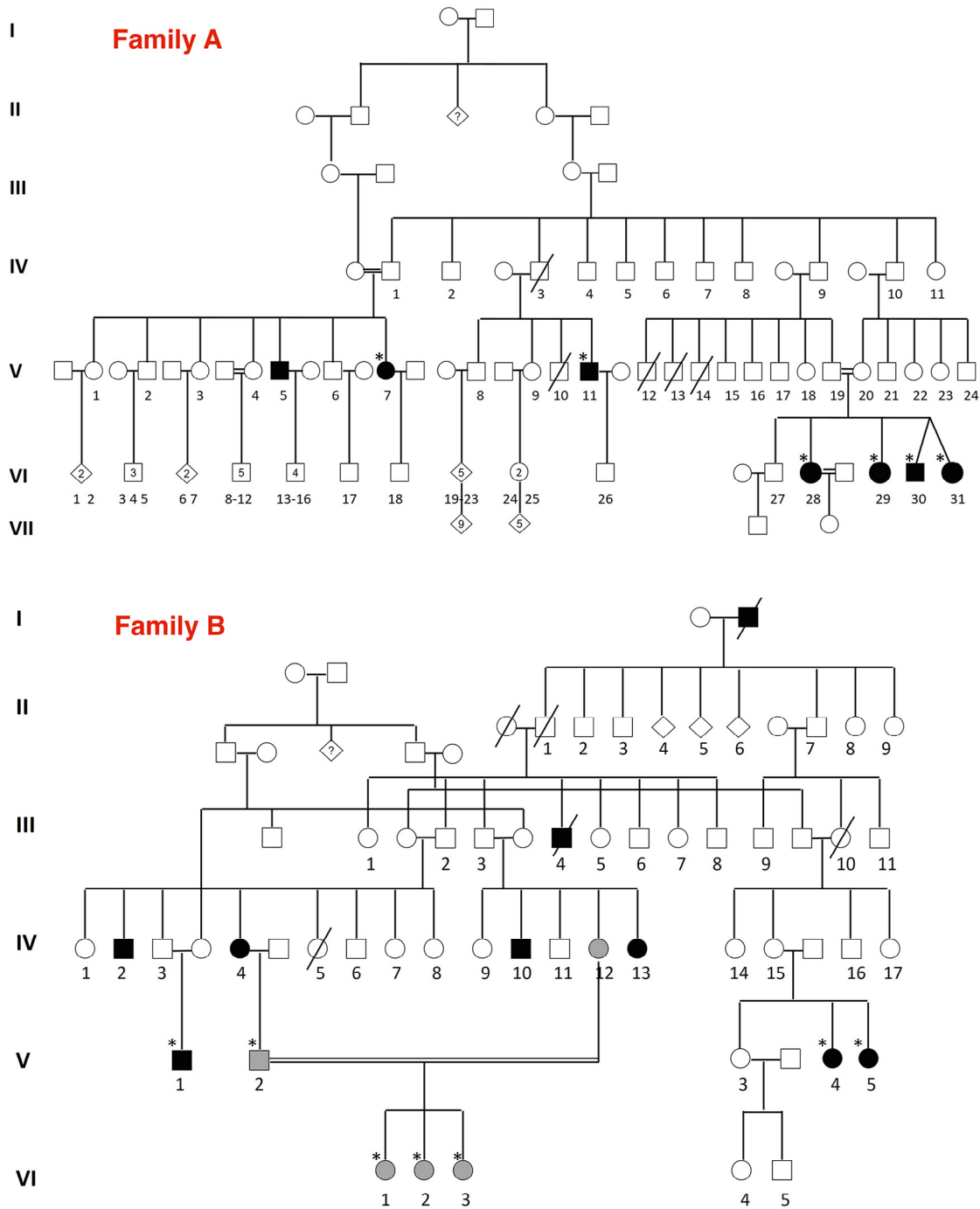


Fig. 1. Family pedigree of the two unrelated Spanish Roma kindreds with congenital myasthenic syndrome caused by the 1267delG mutation in the AChR ϵ subunit. Members of the families who have been presented in this work are marked with an asterisk. Members of the family with clinical symptoms and absence of the *CHRNE* 1267delG mutation are colored in gray.

Respiratory symptoms were not common among our patients: only two experienced respiratory crises during infancy that required ventilatory support. Those exacerbations were precipitated by minor infections, fever, or no obvious trigger. None of them have required nocturnal ventilatory support. Cognitive abilities seem to be preserved in all the patients. Dysmorphic features were rarely observed: mild high-arched palate was noted in several patients.

The disease course has remained stable throughout life or was slowly progressive in six patients. A relatively rapid progression of the disease was noted in two patients (Patients A-VI.28 and B-V.4). It was associated with pregnancy in one of them (patient A-VI.28). Interestingly, one patient (patient B-V.1) had significant clinical fluctuations with periods of clinical worsening during months or years, with subsequent return to the previous state. He lost the ability to walk

Table 1
Individual clinical symptoms of the 9 patients with a CHRNE 1267delG mutation.

Patient	Sex	Age of onset	First symptoms	Delayed motor milestones/ age at walking	Age at diagnosis	Actual age (years)	Ptosis/ ophthalmoparesis/ facial weakness/ dysphagia	Proximal weakness/distal weakness	Neck muscles weakness/ scoliosis	Disease course	Respiratory crisis	Actual treatment	Impaired ambulation
A-VI.28	F	1 m	Hypotonia, sucking, ophthalmoparesis	+/24 m	10 y	20	+/+/+/+	+/-	+/+	PROG	+	Pyr	Yes
A-VI.29	F	9 y	Ptosis, ophthalmoparesis	-/13 m	9 y	16	+/+/-/-	-/-	-/-	EST/SP	-	Pyr	No
A-VI.30	M	1 m	Hypotonia, sucking, ophthalmoparesis	- / 18 m	1 m	8	+/+/+/+	-/-	+/-	EST/SP	-	Pyr	No
A-VI.31	F	1 y	Ptosis	+/20 m	1 y	8	+/+/+/+	-/-	-/-	EST/SP	-	Pyr	No
A-V.7	F	2 y	Ptosis	-/12 m	22 y	34	+/+/+/+	+/-	+/-	EST/SP	-	Pyr	No
A-V.11	M	2 y	Ptosis	-/13 m	30 y	30	+/+/+/+	+/-	-/-	EST/SP	-	Pyr	No
B-V.1	M	1 m	Hypotonia, sucking, ophthalmoparesis, respiratory distress	-/18 m	2.5 y	30	+/+/+/+	+/-	+/+	EX	+	Pyr + 3,4-DAP	Yes
B-V.4	F	1 m	Hypotonia, sucking, ophthalmoparesis	-/18 m	6 y	32	+/+/+/+	+/-	+/+	PROG	-	Pyr + 3,4-DAP	Yes
B-V.5	F	6 y	Ptosis	-/12 m	8 y	20	+/+/-/-	+/-	-/-	EST/SP	-	Pyr + 3,4-DAP	No

+: yes, present; -: not present; m: month, y: year; Pyr: pyridostigmine; EST/SP: stable or slow progression; PROG: progressive; EX: exacerbations.

autonomously for two years during one of these exacerbations and he later recovered. Three representative case histories of progressive and/or fluctuating course are described below in more detail.

The individual clinical data are summarized in Table 1.

3.2. Electrophysiological studies

Motor and sensory nerve conduction studies were performed in eight of nine patients and were normal in all. Double compound muscle action potential in response to single nerve stimulus was not found in any patient. Decremental response following repetitive nerve stimulation was found in two out of eight patients. Electromyography was performed in the same eight patients and revealed myopathic features in three.

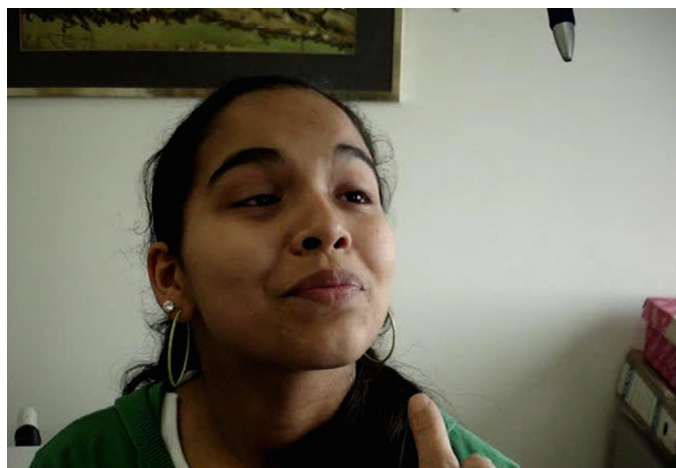


Fig. 2. Frontal view of patient A-VI.28 when she was 13 years old, after pyridostigmine treatment. Note the bilateral ptosis.

The individual electrophysiological studies are summarized in Table 2.

3.3. Laboratory studies and investigations of muscle biopsy specimens

AChR antibodies were not detected in any of the five patients in whom testing was performed. The CK level was normal in the five patients tested.

As the main first suspected diagnosis was a myopathy, three patients underwent muscle biopsy. Variation in fiber size was present in all three. Type one fiber predominance was observed in one. No biopsy showed tubular aggregates with the panel of histological and histochemical stains applied. The individual muscle biopsies are summarized in Table 2.

3.4. Response to treatment

The nine patients were initially treated with pyridostigmine and all responded positively, but not in all the cases the response was complete. The mean dosage of pyridostigmine was 4.8 mg/kg/day in the pediatric population (ranging from 3.6 to 7.2 mg/kg/day) and 260 mg/day in the adults (ranging from 120 to 360 mg/day), taken in three to five divided doses. 3,4-Diaminopyridine (3,4-DAP) was added in three adult patients. It was instituted at 55 mg/day, taken in three divided doses. It resulted in a further clinical improvement and it allowed a reduction in the dosage of pyridostigmine. No significant side effects were reported. The mean dosage of pyridostigmine in patients who received 3,4-DAP was 170 mg/day (ranging from 60 to 360 mg/day). Patient B-V.4 responded partially to pyridostigmine and 3,4-DAP, the reason for which ephedrine was associated. Ephedrine was subsequently removed because no clinical benefit was observed.

Table 2
Complementary investigations of the 9 patients with a CHRNE 1267delG mutation.

Patient	Electrophysiology			Cretin kinase	Muscle biopsy findings	
	RNS decrement	Double CMAP	Myopathic potentials		Variable fiber size	Type 1 pred/ type 2 atrophy
A-VI.28	–	–	–	<180	+	–
A-VI.29	–	–	–	nd	nd	nd
A-VI.30	–	–	–	nd	nd	nd
A-VI.31	–	–	+	nd	nd	nd
A-V.7	–	–	–	<180	+	–
A-V.11	–	–	+	<180	+	+
B-V.1	+	–	–	<180	nd	nd
B-V.4	+	–	+	<180	nd	nd
B-V.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd

+: yes, present; –: not present; nd: not done.

3.5. Representative histories of patients with a progressive and/or fluctuating course

Patient A-VI.28. A 19-year-old woman presented with generalized hypotonia, sucking problems and ophthalmoplegia at the age of 1 month. Motor developmental milestones were delayed, she was able to walk autonomously at 24 months. The course of the disease was stable up to 18 years: ptosis, ophthalmoparesis, facial weakness, mild proximal weakness and a mild scoliosis were observed (Video S1). Symptoms worsened significantly at the age of 18 associated with pregnancy and even more after delivery. She was able to walk more than 500 meters before pregnancy and after the delivery she was not able to walk more than 100 meters. Six months after the delivery she showed a mild progressive improvement but she still has not recovered her pre-pregnancy clinical status, twelve months after delivery. Clinical worsening in patients with CMS during pregnancy, sometimes irreversible, has been previously reported [18].

Patient B-V.1. A 30-year-old man presented at neonatal period with generalized hypotonia, neonatal respiratory distress, ophthalmoplegia and sucking problems. The course of the disease is characterized by fluctuations. This is a paradigm case of exacerbations in CMS that may appear throughout the disease, even over long periods.

He permanently showed ptosis, facial weakness, and predominantly proximal weakness (he was able to maintain his upper extremities raised for just thirty seconds and he needed support to climb stairs). He has had several exacerbations with subsequent spontaneous improvement throughout his life. Exacerbations presented with worsening of the oculomotor symptoms, swallowing and increased weakness. In the most serious of all the exacerbations he lost the capacity to ambulate and was confined to a wheelchair during two years, from 21 to 23 years old. Some exacerbations were preceded by infections but in most of them an obvious trigger was not found.

Patient B-V.4. A 32-year-old woman was diagnosed with CMS at the age of 6 years. She suffered a significant worsening since the age of 10 years with a progressive easy fatigability and proximal and distal weaknesses. Currently she is not able to walk autonomously more than 10 meters, so she is confined to a wheelchair. As weakness and fatigability also affect upper

extremities she is not able to maintain her arms raised for more than four seconds. She did not improve despite increasing doses of pyridostigmine and 3,4-DAP.

3.6. Clinical phenotype of affected family members where mutation was not detected

Unexpectedly, ϵ 1267delG mutation was not found in five of the fourteen clinically affected family members. Four of them had been treated with anticholinesterase inhibitor therapy for several years. Each of these five individuals who do not harbor the familial mutation was also reassessed and underwent a new detailed clinical examination after genetic results were obtained.

Disease onset ranged from 1 to 12 years (Mean 7.6 years; median 10 years). Fatigability, proximal muscle weakness and subjective diplopia were constant complaints in all the five cases. Bulbar symptoms were referred by four of them. Ophthalmoparesis, ptosis and facial weakness were not observed in any of them. The individual clinical data are summarized in Table 3.

The index case was a 21-year-old woman (patient B-VI.1), product of a first-degree consanguineous marriage, who complained of fatigability, proximal weakness and gait disturbances since the age of 12 years with daily and seasonal fluctuations. Her parents (patients B-V.2 and B-IV.12) and her two sisters (patients B-VI.2 and B-VI.3) also reported similar symptoms and had functional limitations (e.g. climbing stairs, walking, and lifting their arms for combing and brushing their hair). Most of them reported diplopia, intermittent dysphagia and dysarthria. They were treated with ACEI and 3,4-DAP with subjective improvement. On examination they referred diplopia but no ophthalmoparesis or substantial facial weakness was observed. They showed fatigability with fatigue maneuvers in proximal limb muscles. Conventional and single fiber EMG studies were performed in three of these individuals and repetitive nerve stimulation in two. No abnormalities were observed.

4. Discussion

Here, we present a comprehensive description of the clinical findings of nine patients with CMS due to a homozygous

Table 3
Individual clinical symptoms of the 5 affected family members where *CHRNE* 1267delG mutation was not detected.

Patient	Sex	Age of onset	First symptoms	Delayed motor milestones/age at walking	Age at diagnosis	Actual age (years)	Ptosis/ ophthalmoparesis/ facial weakness/ dysphagia	Proximal weakness/ distal weakness	Neck muscles weakness/ scoliosis	Disease course	Respiratory crisis	Actual treatment	Impaired ambulation
B-V.2	M	3 y	Fatigability, proximal weakness	~14 m	43 y	47	-/-/+	+/-	-/-	EST/SP	-	Pyr	Yes
B-IV.12	F	10 y	Fatigability, proximal weakness	~12 m	41 y	45	-/-/+	+/-	-/-	EST/SP	-	No	No
B-VI.1	F	1 y	Proximal weakness	~17 m	20 y	27	-/-/+	+/-	-/+	EX	-	Pyr + 3,4-DAP	Yes
B-VI.3	F	12 y	Fatigability, proximal weakness	~12 m	14 y	19	-/-/-	+/-	+/-	EST/SP	-	Pyr + 3,4-DAP	Yes
B-VI.2	F	12 y	Proximal weakness, gait difficulties, dysphagia	~12 m	14 y	21	-/-/+	+/-	+/-	PROG	-	Pyr + 3,4-DAP	Yes

+: yes, present; -: not present; m: month, y: year; Pyr: pyridostigmine; EST/SP: stable or slow progression; PROG: progressive; EX: exacerbations.

1267delG mutation in *CHRNE*. To our knowledge, this is the first time such a large number of CMS patients with a single homozygous mutation are compiled in a single study. Furthermore, all patients were followed up over a period of several years allowing assessment of disease course and progression. This cohort of patients with a long-term follow-up opens up the possibility that the phenotype linked to 1267delG mutation may be more heterogeneous than previously thought.

Previously described phenotype of *CHRNE*-related CMS typically presents at birth or infancy (Table 4). Remarkably, in our subset of *CHRNE*-CMS patients the onset was after the age of 6 years in nearly a quarter of them (Table 1). This finding is in some contrast to previous studies [12] that considered that the onset occurred during the first year of life in all the patients with a *CHRNE* 1267delG mutation (Table 4).

Ophthalmoparesis and bilateral symmetric ptosis were constant findings in our patients, which is similar to other series. They are reliable criteria for distinguishing *CHRNE*-CMS from other forms of CMS, although they are not specific. As previously observed in other studies, facial weakness and mild

bulbar symptoms were also common and they were found in approximately 78% of our patients [12,15]. Neck muscle weakness was often associated. Motor development has rarely been considered as delayed, although the median age for acquisition of certain milestones as autonomous gait was significantly higher in our series than that of the general population.

Two-thirds of our patients had proximal limb weakness. Although it was not observed in the three pediatric patients, it was a constant finding in all the six adults. It was moderate or severe in a half of these patients and some of them were wheelchair bound permanently or seasonally during exacerbations. These findings suggest that proximal limb weakness may be a common sign in adults with a *CHRNE* 1267delG mutation, even if it is not present in the early stages of the disease. A clear progressive course was observed in up to one-fifth of our patients. Although a worsening in any neurological disease could be explained by weight gain, endocrine changes, infections or other causes, there is no direct evidence that any of these relevant factors were present.

As previously described, symptoms of CMS frequently worsen during pregnancy and especially in the postpartum period. The case of patient A-VI.28, who had not recovered her clinical condition prior to the pregnancy, emphasizes the risk of irreversible progression in patients with CMS during pregnancy. According to previous reports, most women recover their previous clinical condition around six months after delivery [18].

We report the novel association of *CHRNE*-related CMS and a fluctuating course. Patient B-V.1 presents with a changing disease course with aggravations and subsequent restoration. To our knowledge, this course had been reported to date in *COLQ* and *DOK7*-related CMS [19,20], but not as a characteristic of *CHRNE*-related CMS.

Beneficial effect from esterase inhibitors treatment was a constant finding, similar to that observed in the previous published *CHRNE* series, but the response was not complete in all the cases. Addition of 3,4-DAP resulted in further clinical improvement in all the patients in which it was introduced. It allowed a reduction in the dosage of pyridostigmine.

Table 4
Summary table comparing clinical symptoms and laboratory findings in our 9 patients with a *CHRNE* 1267delG mutation and the previously ϵ 1267delG-mutant patients published by Abicht et al. [12].

Clinical symptoms or EMG findings	Our patients	%	Published cases	%
Ptosis	9/9	100	13/13	100
Ophthalmoparesis	9/9	100	12/13	92
Bulbar weakness	7/9	78	13/13	100
Facial weakness	7/9	78	na	na
Proximal weakness	6/9	67	na	na
Neck muscle weakness	5/9	56	na	na
Stable course	6/9	67	13/13	100
Impaired ambulation	3/9	33	4/12	33
Delayed motor milestones	2/9	22	4/11	36
Age at onset < 1 y	4/9	44	13/13	100
Positive effect of ACEIs	9/9	100	13/13	100
EMG: decrement	2/8	25	7/9	78

Surprisingly, 1267delG mutation was ruled out in five individuals initially labeled as affected. The clinical phenotype of these patients may be explained by a fatigue chronic syndrome or somatization. An alternative possibility to explain this bizarre finding is that these relatives carry a different mutation in another gene involved in neuromuscular function. It should not be discarded, especially taking into account the consanguinity. As a third hypothesis, environmental contribution could play a role in presence of fatigability or weakness. Nutritional and toxic factors should not be dismissed. Despite these individuals referred similar symptoms to those found in CMS, clinical examination revealed absence of ptosis or ophthalmoparesis. This exceptional observation remarks the importance of performing genetic studies to confirm the diagnosis in all the family members, even in subjects with a clinical picture compatible with that observed among their relatives.

This review illustrates a *CHRNE* 1267delG-related phenotype that may not be as homogeneous as had been previously described. It contrasts with previous idea that considered this form of CMS as benign, non progressive, and with a low impact on the capacity of ambulation. Our observations indicate that founder European Roma mutation 1267delG leads to a phenotype, further characterized by ophthalmoplegia, bilateral ptosis, and a good response to anticholinesterase drugs and 3,4-DAP; but also by facial weakness, bulbar symptoms, neck muscle weakness, and proximal limb weakness that sometimes entails the loss of ambulation.

Phenotypic heterogeneity in these families is evidenced by differences in the age of onset (0–9 years), rate of progression, and severity of the disease. It seems that a wide spectrum of phenotypes can be associated with a single mutation even in a single kinship. Severity of disease is quite different among 1267delG patients, ranging from ptosis and involvement of extraocular muscles as the only symptom of CMS to disabling general weakness and marked fatigability. In any case, it seems that the course of the disease might not be as benign as was previously thought since the proportion of patients with a progressive or fluctuating course is 33% in our series.

These cases broaden the spectrum of *CHRNE*-related CMS due to 1267delG mutation to include progressive course, with or without fluctuations. Further studies of the basis for variable phenotype in this single mutation, even in a single kinship, are warranted, as the precise mechanisms are not well understood. Associated varying-phenotype mutations, epigenetic mechanisms and environmental factors may play a significant role in the different expression of the disease in individuals with the same mutation. Further studies are needed to predict which patients with *CHRNE*-related CMS due to 1267delG mutation would have a stable or a progressive course.

Acknowledgements

The first author was partially supported by a SENEP (Spanish Pediatric Neurology Society) fellowship.

The authors thank the patients and family members for their participation in this study.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.nmd.2016.08.005](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.08.005).

References

- [1] Engel AG. Current status of the congenital myasthenic syndromes. *Neuromuscul Disord* 2012;22(2):99–111.
- [2] Engel AG. Congenital myasthenic syndromes in 2012. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012;12:92–101.
- [3] Abicht A, Dusl M, Gallenmuller C, et al. Congenital myasthenic syndromes: achievements and limitations of phenotype-guided gene after-gene sequencing in diagnostic practice: a study of 680 patients. *Hum Mutat* 2012;33:1474–84.
- [4] Rodríguez Cruz PM, Palace J, Beeson D. Congenital myasthenic syndromes and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol* 2014;27:566–75.
- [5] Engel AG, Shen XM, Selcen D, et al. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol* 2015;14(4):420–34.
- [6] Ruff RL, Rutecki P. Faster, slower, but never better. Mutations of the skeletal muscle acetylcholine receptor. *Neurology* 2012;79:404–5.
- [7] Lobos EA. Five subunit genes of the human muscle nicotinic acetylcholine receptor are mapped to two linkage groups on chromosomes 2 and 17. *Genomics* 1993;17:642–50.
- [8] Missias AC, Chu GC, Klocke BJ, et al. Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch. *Dev Biol* 1996;179:223–38.
- [9] Engel AG, Ohno K, Bouzat C, et al. End-plate acetylcholine receptor deficiency due to nonsense mutations in the ϵ subunit. *Ann Neurol* 1996;40:810–17.
- [10] Milone M, Wang HL, Ohno K, et al. Mode switching kinetics produced by a naturally occurring mutation in the cytoplasmic loop of the human acetylcholine receptor ϵ subunit. *Neuron* 1998;20:575–88.
- [11] Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, et al. Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the epsilon subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:758–62.
- [12] Abicht A, Stucka R, Karcagi V, et al. A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology* 1999;53:1564–9.
- [13] Morar B, Gresham D, Angelicheva D, et al. Mutation history of the Roma/Gypsies. *Am J Hum Genet* 2004;75:596–609.
- [14] Mihaylova V, Scola RH, Gervini B, et al. Molecular characterisation of congenital myasthenic syndromes in Southern Brazil. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81(9):973–7.
- [15] Faber CG, Molenaar PC, Vles JSH, et al. AChR deficiency due to ϵ -subunit mutations: two common mutations in the Netherlands. *J Neurol* 2009;256:1719–23.
- [16] Ohno K, Anlar B, Ozdirim E, et al. Myasthenic syndromes in Turkish kinships due to mutations in the acetylcholine receptor. *Ann Neurol* 1998;44(2):234–41.
- [17] Lorenzoni PJ, Scola RH, Kamoi Kay CS, et al. Congenital myasthenic syndrome: a brief review. *Pediatr Neurol* 2012;46:141–8.
- [18] Servais L, Baudoin H, Zehrouni K, et al. Pregnancy in congenital myasthenic syndrome. *J Neurol* 2013;260(3):815–19.
- [19] Müller JS, Herczegfalvi A, Vilchez JJ, et al. Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes. *Brain* 2007;130:1497–506.
- [20] Mihaylova V, Müller JS, Vilchez JJ, et al. Clinical and molecular genetic findings in COLQ-mutant congenital myasthenic syndromes. *Brain* 2008;131:747–59.

ANEXO 3

KLHL40-related nemaline myopathy with a sustained,
positive response to treatment with acetylcholinesterase

inhibitors.



***KLHL40*-related nemaline myopathy with a sustained, positive response to treatment with acetylcholinesterase inhibitors**

D. Natera-de Benito¹ · A. Nascimento² · A. Abicht^{3,4} · C. Ortez² ·
C. Jou⁵ · J. S. Müller⁶ · T. Evangelista⁶ · A. Töpf⁶ · R. Thompson⁶ ·
C. Jimenez-Mallebrera^{2,7} · J. Colomer² · H. Lochmüller⁶

Received: 18 November 2015 / Revised: 26 December 2015 / Accepted: 28 December 2015 / Published online: 11 January 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Congenital myopathies are a group of inherited muscle disorders characterized by hypotonia, weakness and a non-dystrophic muscle biopsy with the presence of one or more characteristic histological features. Neuromuscular transmission defects have recently been reported in several patients with congenital myopathies (CM). Mutations in *KLHL40* are among the most common causes of severe forms of nemaline myopathy. Clinical features of affected individuals include fetal akinesia or hypokinesia, respiratory failure, and swallowing difficulties at birth. Muscle weakness is usually severe and nearly half of the individuals have no spontaneous antigravity movement. The average age of death has been reported to be 5 months in a

recent case series. Herein we present a case of a patient with a nemaline myopathy due to *KLHL40* mutations (c.604delG, p.Ala202Argfs*56 and c.1513G>C, p.Ala505Pro) with an impressive and prolonged beneficial response to treatment with high-dose pyridostigmine. Myasthenic features or response to ACEI have not previously been reported as a characteristic of nemaline myopathy or *KLHL40*-related myopathy.

Keywords *KLHL40* · Congenital myopathies · Nemaline myopathies · Neuromuscular junction · Acetylcholinesterase inhibitors · Congenital myasthenic syndromes

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00415-015-8015-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ D. Natera-de Benito
daninatera@hotmail.com

¹ Department of Pediatrics, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain

² Department of Neuromuscular Diseases, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

³ Friedrich-Baur-Institute, Ludwig-Maximilians-University Munich, 80336 Munich, Germany

⁴ Medical Genetics Center, Munich, Germany

⁵ Pathology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

⁶ John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE1 3BZ, UK

⁷ Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Introduction

Congenital myopathies (CM) are a heterogeneous group of inherited skeletal muscle disorders which typically present at birth or in early infancy with hypotonia and weakness [1, 2]. Severity ranges from foetal akinesia to milder early and later onset cases. Classically, CM have been divided into subtypes based on the predominant histopathologic findings [3, 4]. Recent advances in molecular genetics have helped to recognize an increasing number of genes implicated in CM. There is considerable overlap with defects in the same gene resulting in different pathologies and defects in different genes resulting in the same pathology [2–5].

Recent reports have illustrated the evidence of neuromuscular transmission defects in patients with confirmed CM [6, 7]. Secondary neuromuscular junction (NMJ) abnormalities and positive response to anticholinesterase inhibitors (ACEI) have been reported in several types of CM such as centronuclear myopathies caused by mutations

in *BINI* [8] and *DNM2* genes [9]; X-linked myotubular myopathies with mutations in *MTM1* gene [6]; congenital myopathies with fibre type disproportion caused by mutations in *TPM3* [10] and *RYR1* genes [11]; and cap myopathies with *TPM2* mutations [7].

Nemaline myopathies (NM) encompass a set of genetically heterogeneous diseases that are defined pathologically by the presence of characteristic rod-like structures, called nemaline bodies, in myofibers [12]. Clinically, presentation can vary from mild muscle dysfunction to complete akinesia. There is currently no effective treatment for NM patients other than symptomatic treatments. Nine causative genes have been recognized to date: tropomyosin 3 (*TPM3*), nebulin (*NEB*), α 1 actin (*ACTA1*), tropomyosin 2 (*TPM2*), troponin T type 1 (*TNNT1*), cofilin 2 (*CFL2*), kelch repeat and BDB domain containing 13 (*KBTD13*), kelch-like family member 41 (*KLHL41*), and kelch-like family member 40 (*KLHL40*). NM is considered as a thin filament disease since mostly of the causative genes encode components of the sarcomere thin filament [13].

We here describe a case of NM due to *KLHL40* mutations with a dramatic and prolonged improvement after treatment with ACEI. To our knowledge myasthenic features have not previously been reported as a characteristic of nemaline myopathy.

Patient and methods

This female infant was the second child of a healthy, non-consanguineous, Philippine couple. The family history was unremarkable. No similarly affected individuals, birth defects, or miscarriages were reported. Ultrasound studies during pregnancy revealed polyhydramnios and reduced foetal movements. She was born at 39 weeks of gestation. Her weight was 2775 g (p14, -1.1 SD), her length was 46 cm (p2, -2.07 SD) and her head circumference was 34 cm (p44, -0.17 SD). Apgar score was 8/9/9. At birth she exhibited marked generalized hypotonia, congenital stridor, weak cry, and respiratory difficulties,

requiring tracheal intubation and bag-valve-mask ventilation within minutes after birth and subsequently admission to neonatal intensive care unit (ICU). Continuous positive airway pressure support was required during the first 48 h of life.

Neurologic evaluation revealed generalized muscle weakness predominantly distal, absent deep tendon reflexes and a myopathic facies without ptosis or ophthalmoplegia. She was discharged from ICU after 7 days and remained hospitalized for 2 months due to feeding difficulties and hypotonia. She presented sucking problems from the newborn period necessitating nasogastric feeding until the age of 3 months.

Routine laboratory investigations, including metabolic screening tests in blood and urine, were normal. Karyotype was 46, XX and Prader-Willi syndrome was ruled out by fluorescence in situ hybridization for deletion of chromosome 15q11.2 and methylation analysis for maternal uniparental disomy and imprinting defects. Cranial and medullary magnetic resonance imaging found no abnormalities. Electromyography of proximal (deltoid) and distal (abductor pollicis brevis and/or abductor digiti minimi) muscles performed at the age of 3 months showed myopathic features. Peripheral nerve conduction studies found no abnormalities. Repetitive nerve stimulation in distal muscles at 3 and 50 Hz did not show a decremental response. Creatine phosphokinase levels were in normal range.

She repeatedly required hospitalization for recurrent aspiration pneumonia during the first year of life, despite gastrostomy at 11 months of age. At 12 months she was admitted to ICU for respiratory failure in the context of a respiratory infection. At that time she weighed 4.2 kg. Scarcely any spontaneous movement was observed, head control had not been acquired, and deep tendon reflexes were absent. On neurological examination she showed hypotonia, generalized muscle weakness, and a myopathic facies without ptosis or ophthalmoplegia (Fig. 1). She was referred for further assessment and treatment to a specialized neuromuscular unit.



Fig. 1 Views of the female with *KLHL40*-related myopathy when she was 12 months old, before treatment was instituted

CM and congenital myasthenic syndrome (CMS) were discussed as the most probable clinical diagnoses. A muscle biopsy from the *biceps brachii* identified variability in fiber size with occasional small, round fibers and type one fibre predominance with no other specific features. As CMS was suspected, a therapeutic trial with pyridostigmine was instituted at 30 mg three times a day, equaling 20 mg/kg/day. After 3 days a dramatic beneficial response was observed, with a remarkable improvement in ventilation. After 2 weeks a significant objective clinical improvement had been observed: spontaneous movements were remarkably increased and her face showed more expression. Head control was acquired after 4 weeks of treatment (Fig. 2), after 2 months she was sitting unassisted. Supported gait was achieved after 6 months (Video 1). Eighteen months after onset of treatment, she was able to walk independently, at the age of 2.5 years (Video 2).

Encouraged by this improvement that pointed to a CMS, clinicians reconsidered a possible neuromuscular transmission defect. Mutation analysis revealed two heterozygous missense variants in the *DOK7* gene, c.134C>T (p.Ser45Leu) and c.1406C>A (p.Pro469His). Antibodies against acetylcholine receptor and muscle specific tyrosine kinase tested negative. At the time we assumed that the two *DOK7* variants were the genetic cause of the disease in this patient and she was included in the first series of patients

with CMS due to *DOK7* mutations reported by Müller et al. in 2007 [14]. When first reported, she was 2 years old and we were unable to predict her long-term response to anti-cholinesterase inhibitors (ACEIs).

Oral ACEIs at 20 mg/kg/day have been maintained given the favorable clinical response. Ephedrine at 30 mg once a day, equaling 2 mg/kg/day, was added at the age of 5.5 years, as it is an effective treatment for *DOK7*-related CMS [15, 16]. An improvement in her walking was reported with an improved endurance for distances. Additionally, time for rising from floor was reduced.

Although a transient partial improvement with ACEIs is observed in 10 % of patients with *DOK7* mutations, this effect subsides and disappears within the first weeks of treatment [14–18]. In view of such an impressive and prolonged beneficial effect of ACEI treatment in our patient, the muscle biopsy was revisited. On this occasion, modified Gomori trichrome stains showed, in a different cryosection slice, red-staining rods in peripheral clusters and within the fibers (Fig. 3). The findings suggested a NM. Presence of electron-dense nemaline bodies in the myofibers was confirmed by electron microscopy. In consideration of the muscle biopsy findings, a multi-gene panel testing for CM and CMS was performed and two novel heterozygous recessive mutations were identified in *KLHL40*: a deletion c.604delG in exon 1 resulting in a frameshifting mutation (p.Ala202Argfs*56), and a sequence variant in exon 4, c.1513G>C resulting in a missense mutation (p.Ala505Pro). None of these changes had been previously reported in the Leiden Muscular Dystrophy database (www.dmd.nl) and they were both absent in a population of 120,000 control chromosomes (Exac, www.exac.broadinstitute.org). The missense change was predicted pathogenic or disease causing by all the in silico prediction tools used (Mutation Taster, www.mutationtaster.org; UMD-Predictor, www.umd-predictor.eu; SIFT, www.provean.jcvi.org and PolyPhen-2, www.genetics.bwh.harvard.edu). Both asymptomatic parents were heterozygous carriers: the mother carried the heterozygous c.604delG variant and the father the heterozygous



Fig. 2 Frontal view of the female with nemaline myopathy when she was 14 months old, after pyridostigmine treatment

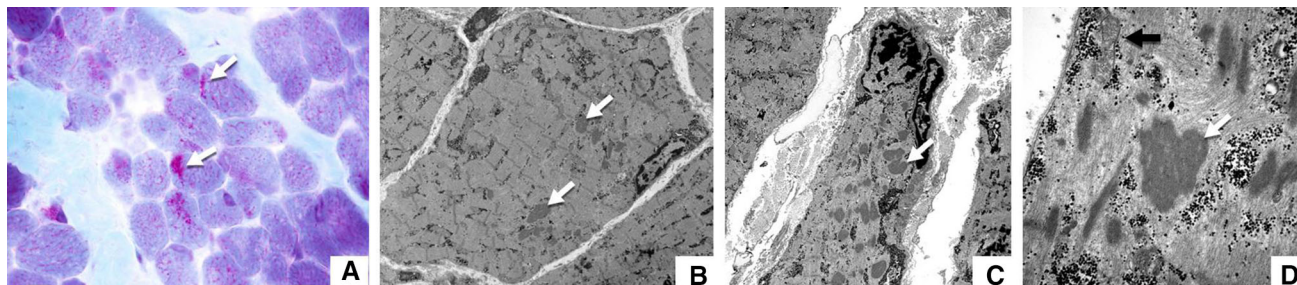


Fig. 3 Muscle biopsy from *biceps brachii* in the case reported showing **a** red-staining rods in peripheral clusters and within the fibers (white arrows) with modified Gomori trichrome ($\times 6000$) and **b–**

d electron dense rod-shaped nemaline bodies (white arrows) with electron microscopy ($\times 16,000$). A mitochondria (black arrow) is observed in (d)

c.1513G>C (p.Ala505Pro) variant. Furthermore, in recent years it has been questioned whether c.134C>T (p.Ser45-Leu) is a pathogenic mutation and currently we assume that it is likely a *DOK7* benign polymorphism. Cossins et al. [19] suggested that it is a non-pathogenic variant based on functional assays, its occurrence in patients with alternative genetic diagnoses, and its occurrence within the general population. We suggest that the pathogenicity of c.134C>T (p.Ser45Leu) should be reevaluated and the variant may need to be reclassified as a non-pathogenic.

Given the definitive diagnosis of *KLHL40*-related nemaline myopathy, pyridostigmine withdrawal was attempted and resulted in a marked worsening of symptoms, including muscle weakness, walking capacity and feeding difficulties. Thus, pyridostigmine and ephedrine were maintained with good response. The patient is currently 9 years old and weighs 18 kg (Fig. 4). She is receiving pyridostigmine (120 mg three times a day, equaling 20 mg/kg/day) and ephedrine (50 mg once a day, 2.8 mg/kg/day). No adverse effects were noted. Weakness is more pronounced than fatigability, with a generalized pattern including facial and distal involvement. She shows a myopathic facies, without ptosis or limitation of eye movements. Facial muscle weakness is more evident when smiling, with inability to blow or to bury eyelash completely. Progression of weakness has not been noted. Muscle weakness is symmetrical, and strength is (MRC scale): Deltoid, biceps and triceps 4 ± 5 , iliopsoas, gluteus and distal muscles in both upper and lower limbs 4/5. Neck



Fig. 4 Frontal view of the female with *KLHL40*-related myopathy when she was 9 years-old, after pyridostigmine and ephedrine treatment

flexors and extensors 3/5. There was minimal weakness of the quadriceps and the adductors 5–/5. Muscle fatigability is not noted. Repeating the grip myometry test 10 times in succession did not demonstrate a decrease between the first and tenth attempt. To further assess if fatigability occurred in any muscle groups, the component scores of the quantitative myasthenia gravis score (QMG) were examined (Table 1). Scores for diplopia, ptosis, counting, and leg rise time were normal. Scores for swallowing, facial muscles, head lift, and hand grip were notably affected. Score for arm raise time showed only a small decrease from the limit of normal. Deep tendon reflexes were present (1 – 2/5).

Independent ambulation is preserved and even running is possible. She walked 530 m at the 6-min walk test (6MWT), within the standard range for her age. Rise from floor takes her 2 s and she does not show Gowers' maneuver. She is able to climb stairs with support, showing a slight waddle. Mild contractures are present on the ankle dorsiflexion. Persistence of bulbar involvement is remarkable, with nasal voice, expressive language difficulties and a swallowing disorder entails insecurity for oral feeding, preferring percutaneous gastrostomy. Her cognitive development is normal and her academic achievement is good.

Discussion

NM is one of the most common CM. Clinical symptoms include hypotonia, muscle weakness of proximal dominance, respiratory insufficiency, and feeding problems. Congenital onset is usual, but a wide variation in age of onset and disease severity is recognized [12]. Intellectual disability is uncommon. It is assumed that pathogenic mechanism in NM involves a thin filament alteration. The presence of nemaline bodies does not correlate with the severity of the disease. It is believed that decreased contractility due to primary defects in the sarcomere thin filament is the underlying cause for symptoms in NM [20].

Mutations in *KLHL40* (kelch-like family member 40), also known as *KBTD5* (kelch-repeat and BTB (POZ) domain containing 5), have been found to be the most common cause of severe forms of NM in recent series [21]. Clinical features of affected individuals are severe and include fetal akinesia or hypokinesia, respiratory failure, and swallowing difficulties at birth. Muscle weakness is usually severe and nearly half of the individuals have no spontaneous antigravity movement. Multiple joint contractures, pathological bone fractures, and dysmorphic facial features and deformities of the chest, spine, fingers, and feet are also frequent. The average age of death has been reported to be 5 months in a large case series [21, 22].

Table 1 Quantitative myasthenia gravis score and 6-min walk test examined at the age of 9 years

Component	Measuring in our patient at 9 years old	Lower limit of normal in adult women
Lateral diplopia (lateral gaze) (s)	60	60
Ptosis (upward gaze) (s)	60	60
Eyelid closure	Incomplete eyelid closure	Normal
Dysarthria with counting 1–50	None	None
Swallowing 4 oz water	Unable	Normal
Rise from floor: first time (s)	2'32"	
Right arm held outstretched at 90° (s)	219	240
Left arm held outstretched at 90° (s)	240	240
Head lift 45° supine (s)	0	120
Right leg held outstretched at 45° supine (s)	100	100
Left leg held outstretched at 45° supine (s)	100	100
Repeated sit to stand (number in 1 min)	20	30–40
Rise from floor: second time (s)	2'37"	
Right hand grip (N)	10	90 (lower limit in 9 year-old girls)
Left hand grip (N)	8	80 (lower limit in 9 year-old girls)
Forced vital capacity	Unable to close mouth	
6MWT (m)	530	450

KLHL40 is essential for the maintenance of sarcomere structure and muscle contractility. This protein localizes to the I band and A band of sarcomeres and binds and increases two other proteins located in these bands, NEB and LMOD3. KLHL40 promotes the stability of NEB and LMOD3. Loss of KLHL40 primarily reduces NEB and LMOD3 and this results in a thin filament disruption, with subsequent irregularities of sarcomere Z-discs [13].

The clinico-pathological features in our patient are consistent with the phenotype described in nineteen patients so far [21], and confirm that mutations of *KLHL40* are a common cause of nemaline myopathies. Although weakness was the most prominent feature in our patient, absence of any histological structural defect at first assessment and beneficial clinical response to pyridostigmine pointed towards a CMS. Moreover, the finding of two variants in *DOK7* lead to a diagnosis of *DOK7*-related CMS. Pathologic evidence of purple-stained nemaline bodies on a subsequent reassessment, which are not a feature of CMS histology, was a key evidence to suspect a NM. In addition, sustained benefit from esterase inhibitors is highly unusual in *DOK7*-related CMS and led us re-evaluate the diagnosis eight years after the initial presentation. A definite diagnosis of *KLHL40*-related myopathy was reached by recognizing two novel heterozygous recessive mutations in *KLHL40*. The clinical picture in nemaline myopathy caused by *KLHL40* mutations is often severe. Clinical examination did not reveal fatigability in

our patient (Table 1). This case also exemplifies that novel variants identified in genetic screens need to be carefully assessed before a conclusion regarding their pathogenicity is reached.

The striking long term beneficial effect of ACEI treatment observed in our patient is a novel finding for patients with *KLHL40*-related myopathy. To our knowledge, pyridostigmine has not been introduced in any of the previously reported patients with *KLHL40* mutations. Significant and maintained improvement in endurance and strength in our patient was demonstrated following treatment with a stable response for up to 8 years. Moreover, pyridostigmine withdrawal resulted in marked worsening of symptoms. Combination therapy with ephedrine resulted in further improvement. Beneficial response to treatment with ephedrine in CM has not been described previously. Ephedrine has proven to be effective in some patients with CMS, but the mechanism by which it may affect neuromuscular transmission is unclear. Association of ephedrine to ACEIs may be attempted in those CM patients with good response to anticholinesterase therapy.

There is increasing evidence of neuromuscular transmission defects in several subtypes of CM. Recent reports on various types of CM with secondary NMJ abnormalities suggest that the weakness in some of these patients could in part be related to neuromuscular transmission defects [7]. Beneficial response to pyridostigmine has been described

in some patients with CM. Abnormal neuromuscular transmission had not been reported to date in NM and response to ACEI has not been described in association with *KLHL40* mutations.

Further studies of the basis for ACEI responsiveness in CM are warranted, as the precise mechanism is not well understood. Further studies are needed to predict which patients with CM would have a beneficial response to anticholinesterase inhibitor therapy.

Conclusions

We describe a patient with two novel heterozygous mutations in *KLHL40* consistent with autosomal recessive inheritance, and associated with severe NM. *KLHL40* is an important cause of the severe congenital subtype of nemaline myopathy, in addition to *ACTA1*, *NEB*, *KLHL41*, and *LMOD3* [12]. The clinical presentation of *KLHL40*-NM is characterized by early-onset severe generalized muscle weakness and hypotonia, with respiratory insufficiency and feeding difficulties. Arthrogryposis or congenital contractures, ophthalmoplegia, and a history of reduced fetal movements and polyhydramnios is also common.

We report the novel association of *KLHL40*-related CM responding to acetylcholinesterase inhibition. Our case expands the spectrum of congenital myopathies with secondary defects of neuromuscular transmission. To our knowledge myasthenic features or response to ACEI have not previously been reported as a characteristic of NM or *KLHL40*-related myopathy. This response is especially important in this particular subtype of CM given its severe phenotype.

CM should be considered in the differential diagnosis of infants who present with clinical features of fatigability, response to pyridostigmine or neurophysiological evidence of abnormal function in neuromuscular junction. On the other hand, we wonder whether a therapeutic trial with pyridostigmine should be considered in patients with CM.

Acknowledgments The authors would like to thank the family for taking part in this study.

The Institute of Genetic Medicine in Newcastle is part of the MRC Centre for Neuromuscular Diseases and the TREAT-NMD Alliance (<http://www.treat-nmd.eu>). This study was supported by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement No. 305444 (RD-Connect) and 305121 (Neuromics).

We are indebted to the 'Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Deu per a la Investigacio', integrated in the Spanish Biobank network of ISCIII, for sample procurement.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest None.

Ethical standards The study was approved by the ethics committee.

References

- Sewry C, Jimenez-Mallebrera C, Muntoni F (2008) Congenital myopathies. *Curr Opin Neurol* 21:569–575
- Maggi L, Scoto M, Cirak S et al (2013) Congenital myopathies—clinical features and frequency of individual subtypes diagnosed over a 5-year period in the United Kingdom. *Neuromuscul Disord* 23:195–205
- Colombo I, Scoto M, Manzur AY et al (2015) Congenital myopathies: natural history of a large pediatric cohort. *Neurology* 84(1):28–35
- North KN, Wang CH, Clarke N et al (2014) Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul Disord* 24:97–116
- Böhm J, Vasli N, Malfatti E et al (2013) An integrated diagnosis strategy for congenital myopathies. *PLoS One* 8(6):e67527
- Robb SA, Sewry CA, Dowling JJ et al (2011) Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies. *Neuromuscul Disord* 21:379–386
- Rodríguez Cruz PM, Sewry C, Beeson D et al (2014) Congenital myopathies with secondary neuromuscular transmission defects: A case report and review of the literature. *Neuromuscul Disord* 24(12):1103–1110
- Claeys KG, Maisonobe T, Böhm J et al (2010) Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation. *Neurology* 74:519–521
- Gibbs EM, Clarke NF, Rose K et al (2013) Neuromuscular junction abnormalities in DNM2-related centronuclear myopathy. *J Mol Med (Berl)* 91:727–737
- Munot P, Lashley D, Jungbluth H et al (2010) Congenital fibre type disproportion associated with mutations in the tropomyosin 3 (TPM3) gene mimicking congenital myasthenia. *Neuromuscul Disord* 20:796–800
- Illingworth M, Main M, Pitt M et al (2014) RYR1-related congenital myopathy with fatigable weakness, responding to pyridostigmine. *Neuromuscul Disord* 24(8):707–712
- Wallgren-Pettersson C, Sewry CA, Nowak KJ et al (2011) Nemaline myopathies. *Semin Pediatr Neurol* 18(4):230–238
- Garg A, O'Rourke J, Long C et al (2014) *KLHL40* deficiency destabilizes thin filament proteins and promotes nemaline myopathy. *J Clin Invest* 124(8):3529–3539
- Muller JS, Herczegfalvi A, Vilchez JJ et al (2007) Phenotypical spectrum of *DOK7* mutations in congenital myasthenic syndromes. *Brain* 130(pt 6):1497–1506
- Lashley D, Palace J, Jayawant S et al (2010) Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in *DOK7*. *Neurology* 74(19):1517–1523
- Schara U, Barisic N, Deschauer M et al (2009) Ephedrine therapy in eight patients with congenital myasthenic syndrome due to *DOK7* mutations. *Neuromuscul Disord* 19(12):828–832
- Klein A, Pitt MC, McHugh JC et al (2013) *DOK7* congenital myasthenic syndrome in childhood: early diagnostic clues in 23 children. *Neuromuscul Disord* 23(11):883–891
- Ben Ammar A, Petit F, Alexandri N et al (2010) Phenotype genotype analysis in 15 patients presenting a congenital myasthenic syndrome due to mutations in *DOK7*. *J Neurol* 257:754–766
- Cossins J, Liu WW, Belaya K et al (2012) The spectrum of mutations that underlie the neuromuscular junction synaptopathy in *DOK7* congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 21(17):3765–3775
- Nance JR, Dowling JJ, Gibbs EM et al (2012) Congenital myopathies: an update. *Curr Neurol Neurosci Rep* 12(2):165–174

21. Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL et al (2013) Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 93:6–18
22. Kawase K, Nishino I, Sugimoto M et al (2015) Nemaline myopathy with KLHL40 mutation presenting as congenital totally locked-in state. *Brain Dev* 37(9):887–890

