

José Carlos Roche Bueno

Vias inmunológicas en pacientes con Miastenia Gravis *de novo*

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es
Ara Callizo, José Ramón

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**VIAS INMUNOLÓGICAS EN
PACIENTES CON MIASTENIA GRAVIS
*DE NOVO***

Autor

José Carlos Roche Bueno

Director/es

Ara Callizo, José Ramón

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2013

Universidad de Zaragoza

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina y Psiquiatría

**VÍAS INMUNOLÓGICAS EN
PACIENTES CON MIASTENIA
GRAVIS *DE NOVO***

Memoria presentada para optar al grado de Doctor.

Zaragoza. Septiembre 2012.

JOSÉ CARLOS ROCHE BUENO

El Doctor D. José Ramón Ara Callizo, Médico Jefe del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza y Profesor asociado de la Universidad de Zaragoza hace constar que:

Que el trabajo “Vías inmunológicas en pacientes con Miastenia Gravis *de novo*” presentado por D. José Carlos Roche Bueno ha sido realizado bajo mi dirección y se considera adecuado para ser defendido como tesis para la obtención del grado de Doctor en Medicina de la Universidad de Zaragoza, ante el tribunal que se designe.

Zaragoza, Julio 2012.

Dr. D. José Ramón Ara Callizo

A mis padres

The excessive fatigue he encountered wrecked his constitution; his flesh became macerated; his sinews lost their tone and elasticity; and his eyelids were so heavy that he could not see unless they were lifted up by his attendants...he was unable to walk, but his spirit rising above the ruins of his body directed from the litter on which he was carried by his Indians.

En referencia al jefe nativo americano Opechancanough. Virginia, 1664.

Agradecimientos

A mi director de tesis, José Ramón Ara, por su saber y apoyo constante durante la realización de este proyecto.

A todas las personas del Servicio de Neurología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza que me han acompañado durante estos años, y en especial a José Luis Capablo, Raquel Alarcia por su estímulo y confianza.

A Luis Larrad por la ayuda y consejos sobre los aspectos inmunológicos del trabajo.

A mi coR, Alejandro Sánchez.

Abreviaturas

ACh: acetilcolina

AChR: receptor de acetilcolina (del inglés, *acetylcholine receptor*)

α -BuTx: alfa-bungarotoxina

C: celsius

CK: creatin-kinasa

CPA: célula presentadora de antígenos

CSFI: factor inhibitorio de citocinas

DS: desviación estándar (del inglés *deviation standard*)

EAMG: Miastenia Gravis autoinmune experimental (del inglés, *experimental autoimmune myasthenia gravis*)

EEI: esfínter esofágico inferior

EES: esfínter esofágico superior

EMG: electromiograma

EPP: potencial de placa terminal (del inglés, *end plate potential*)

HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet

Hz: hertzio

IA: inmunoadsorción

Ig: inmunoglobulinas

IgIV: inmunoglobulinas intravenosas

IL: interleucina

IV: intravenosas

LCR: líquido cefalorraquídeo

LB: linfocito B

LEMS: síndrome miasténico de Eaton-Lambert

LES: lupus eritematoso sistémico

LT: linfocito T

LTh: linfocito T helper

MAC: complejo de ataque a la membrana (del inglés, *membrane attack complex*)

MG: Miastenia Gravis

MGFA: asociación Americana de MG (del inglés *Myasthenia Gravis Foundation of America*).

MIR: región inmunogénica principal (MIR, del inglés *Main Immunogenic Región*).

MuSK: tirosina-kinasa específica del músculo

PPE: potencial postsináptico excitador

RMN: resonancia magnética nuclear

RyR: receptor de rianodina (del inglés, *ryanodine receptor*)

S-PE: estreptavidina-ficoeritrina

TAC: tomografía axial computarizada

TPMT: tiopurina metiltransferasa, del inglés *thiopurine methyltransferase*

SFEMG: electromiograma de fibra aislada (del inglés *single-fibre electromyography*)

UNM: unión neuromuscular

VGKC: canales de potasio voltaje dependientes (del inglés *voltaje-gated potassium channels*)

VGCC: canales de calcio voltaje dependientes (del inglés *voltage-gated calcium channels*)

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	25
1.1. Introducción	27
1.2. Epidemiología	28
1.3. Clínica.....	29
1.4. Diagnóstico	30
1.4.1. Farmacológicos.....	30
1.4.1.1. Test de edrofonio	30
1.4.1.2. Test de hielo	31
1.4.2. Electrofisiológicos.....	32
1.4.2.1. Estimulación nerviosa repetitiva.....	32

1.4.2.2. Electromiograma de fibra aislada.....	32
1.4.3. Inmunológicos.....	33
1.4.4. Otras pruebas diagnósticas	34
1.5. Diagnóstico Diferencial	34
1.5.1. Miastenia gravis ocular	34
1.5.2. Miastenia gravis generalizada.....	35
1.6. Tratamiento	37
1.6.1. Sintomáticos: inhibidores de la colinesterasa	37
1.6.2. Inmunomodulares de corto alcance	37
1.6.2.1. Inmunoglobulinas IV	38
1.6.2.2. Plasmaféresis	38
1.6.3. Inmunomoduladores de mantenimiento.....	39
1.6.3.1. Corticoesteroides	39
1.6.3.2. Azatioprina	40
1.6.3.3. Metotrexate.....	41
1.6.3.4. Micofenolato mofetil.....	41
1.6.3.5. Ciclosporina	42
1.6.3.6. Tacrolimus (FK506)	42
1.6.3.7. Ciclofosfamida	43
1.6.3.8. Rituximab	43
1.6.3.9. Otros inmunomoduladores	43
1.6.4. Timectomía	44
2. INMUNOPATOGENIA EN MIASTENIA GRAVIS	45
2.1. Unión neuromuscular.....	47
2.2. Miastenia gravis como enfermedad autoinmune	50
2.3. Miastenia gravis seronegativa.....	51
2.4. Otros autoanticuerpos.....	52

2.5. Anticuerpos frente al AChR	54
2.6. Linfocitos B.....	55
2.7. Subpoblaciones de Linfocitos T helper	57
2.7.1. LTh1.....	58
2.7.2. LTh2.....	58
2.7.3. LTh17.....	60
2.7.4. LT reguladores	61
2.7.5. Equilibrio entre subpoblaciones de LTh	63
2.8. Citocinas	64
2.9. Citocinas estudiadas.....	64
2.9.1. TNF-α.....	64
2.9.2. IL-17.....	66
2.9.3. sCD40L	67
2.9.4. IFN-γ	69
2.9.5. IL-6	70
2.9.6. IL-10.....	71
2.10. Complemento.....	73
2.11. Timo	74
2.12. Inmunogenética	76
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	79
3.1. Justificación.....	81
3.2. Hipótesis	82
3.2.1. Hipótesis inmunológicas.....	82
3.3. Objetivos.....	83
3.3.2. Objetivos clínico-epidemiológicos	83
3.3.1. Objetivos inmunológicos	83
4. MATERIAL Y MÉTODOS	85

4.1. Tipo de estudio	87
4.2. Población de estudio.....	87
4.3. Tiempo de estudio	88
4.4. Población diana	88
4.5. Criterios de inclusión	88
4.6. Criterios de exclusión	88
4.7. Variables de estudio	89
4.7.1. Clínicas	89
4.7.2. Inmunológicas.....	94
4.8. Controles.....	94
4.9. Procesamiento de muestras.....	95
4.10. Tecnología Multiplex.....	96
4.11. Análisis estadístico.....	97
4.11.1. Estadística descriptiva.....	97
4.11.2. Estadística analítica.....	97
4.11.2.1. Análisis univariante	97
4.11.2.2. Análisis bivariante	97
5. RESULTADOS	99
5.1. Sección I: epidemiología.....	101
5.1.1. Casos registrados de MG	101
5.1.1.1. Tasas de incidencia brutas	101
5.1.1.2. Incidencia ajustada a la población aragonesa	103
5.1.1.3. Incidencia ajustada a la población española.....	103
5.1.1.4. Incidencia ajustada europea	103
5.1.1.5. Incidencia ajustada a la población mundial	103
5.1.1.6. Comparativa de incidencias	104
5.1.1.7. Incidencia temporal.....	105

5.1.1.8. Incidencia y edad de debut.....	106
5.1.1.9. Incidencia y senectud.....	107
5.1.2. Edad de presentación	107
5.1.2.1. Edad de presentación y forma clínica	110
5.1.3. Sexo	111
5.1.3.1. Sexo y edad de presentación.....	112
5.1.3.2. Sexo y forma clínica de presentación	112
5.1.4. Gravedad de la enfermedad	113
5.1.5.1. Seropositividad y edad de debut	116
5.1.5.2. Seropositividad y forma de MG	117
5.1.5.3. Seropositividad y sexo	118
5.1.5.4. Seropositividad y autoanticuerpos nucleares	119
5.1.5.5. Título de anti-AChR y forma de MG.....	119
5.1.5.6. Título de anti-AChR y edad de debut de MG	120
5.1.5.7. Título de anti-AChR y sexo	121
5.1.5.8. Título de anti-AChR y autoanticuerpos nucleares	122
5.1.6. Timoma.....	123
5.1.7. Otras enfermedades autoinmunes	124
5.1.7.1. Enfermedades autoinmunes y forma de MG.....	124
5.1.7.2. Enfermedades autoinmunes y edad de presentación.....	125
5.1.7.3. Enfermedades autoinmunes y sexo	125
5.1.7.4. Enfermedades autoinmunes y seropositividad	126
5.1.7.5. Coexistencia de varias condiciones autoinmunes	127
5.1.8. Neoplasias asociadas.....	127
5.1.8.1. Linfoma no Hodgkin. Caso n°.25.	127
5.1.8.2. Adenocarcinoma gástrico. Caso n°.15.....	128
5.1.9. Autoanticuerpos	130

5.1.9.1. Autoanticuerpos y forma de MG	130
5.1.9.2. Autoanticuerpos nucleares y edad de presentación	131
5.1.9.3. Autoanticuerpos nucleares y sexo	131
5.1.10. Respuesta al tratamiento	132
5.1.11. Diagnóstico.....	133
5.1.11.1 Aperistalsis esofágico. Caso n°.22.....	134
5.2. Sección II: inmunología	136
5.2.1. Interferon- γ	136
5.2.1.1. Interferon- γ en pacientes y controles	136
5.2.1.2. Interferon- γ y edad de presentación	136
5.2.1.3. Interferon- γ y sexo.....	136
5.2.1.5. Interferon- γ y timo	138
5.2.1.6. Interferon- γ y seropositividad.....	138
5.2.1.7. Interferon- γ y anti-AChR en suero	138
5.2.1.8. Interferon- γ y otras condiciones autoinmunes	139
5.2.1.9. Interferon- γ y autoanticuerpos nucleares en suero	139
5.2.1.10. Interferon- γ y complemento.....	139
5.2.1.11. Interferon- γ y citocinas.....	140
5.2.2. TNF- α	140
5.2.2.1. TNF- α en pacientes y controles	140
5.2.2.2. TNF- α y edad de presentación	140
5.2.2.3. TNF- α y sexo.....	141
5.2.2.4. TNF- α y forma clínica	141
5.2.2.5. TNF- α y timo	142
5.2.2.6. TNF- α y seropositividad.....	142
5.2.2.7. TNF- α y anti-AChR en suero	142
5.2.2.8. TNF- α y otras condiciones autoinmunes	143

5.2.2.9. TNF- α y autoanticuerpos nucleares en suero	143
5.2.2.10. TNF- α y complemento	144
5.2.2.11. TNF- α y citocinas.....	144
5.2.3. IL-17.....	145
5.2.3.1. IL-17 en pacientes y controles	145
5.2.3.2. IL-17 y edad de presentación	145
5.2.3.3. IL-17 y sexo.....	145
5.2.3.4. IL-17 y forma clínica	146
5.2.3.5. IL-17 y timo	147
5.2.3.6. IL-17 y seropositividad.....	147
5.2.3.7. IL-17 y anti-AChR en suero.....	147
5.2.3.8. IL-17 y otras condiciones autoinmunes	147
5.2.3.9. IL-17 y autoanticuerpos nucleares en suero	148
5.2.3.10. IL-17 y complemento	148
5.2.3.11. IL-17 y citocinas.....	149
5.2.4. sCD40L	149
5.2.4.1. sCD40L en pacientes y controles.....	149
5.2.4.2. sCD40L y edad de presentación	149
5.2.4.3. sCD40L y sexo	150
5.2.4.4. sCD40L y forma clínica.....	150
5.2.4.5. sCD40L y timo.....	151
5.2.4.6. sCD40L y seropositividad.....	152
5.2.4.7. sCD40L y anti-AChR en suero.....	152
5.2.4.8. sCD40L y otras condiciones autoinmunes	152
5.2.4.9. sCD40L y autoanticuerpos nucleares en suero.....	152
5.2.4.10. sCD40L y complemento.....	153
5.2.4.11. sCD40L y citocinas	153

5.2.5. Interleucina-6	154
5.2.6. Interleucina-10	154
5.2.7. Complemento.....	154
5.2.7.1. Complemento en pacientes y controles	154
5.2.7.2. Complemento y edad de presentación	155
5.2.7.3. Complemento y sexo	156
5.2.7.4. Complemento y forma clínica	156
5.2.7.5. Complemento y timo	158
5.2.7.6. Complemento y seropositividad.....	159
5.2.7.7. Complemento y anti-AChR en suero	159
5.2.7.8. Complemento y otras condiciones autoinmunes	160
5.2.7.9. Complemento y autoanticuerpos nucleares en suero	160
5.2.7.10. Correlaciones entre componentes de complemento	161
5.2.7.11. Correlaciones en controles	162
6. DISCUSIÓN	163
6.1. Sección I: epidemiología.....	165
6.1.1. Incidencia.....	165
6.1.2. Edad de presentación	167
6.1.3. Sexo	167
6.1.4. Gravedad de los síntomas	168
6.1.5. Seropositividad	169
6.1.6. Seropositividad anti-MuSK.....	170
6.1.7. Patología tímica	171
6.1.8. Neoplasias asociadas.....	171
6.1.9. Otras enfermedades autoinmunes	172
6.1.10. Aperistalsis esofágica.....	174
6.2.1. IFN- γ	176

6.2.2. TNF- α	177
6.2.3. IL-17.....	178
6.2.4. sCD40L	180
6.2.5. IL-6	181
6.2.6. IL-10.....	181
6.2.7. Complemento.....	182
6.2.7.1. Componente C5	183
6.2.7.2. Complemento C9	184
6.2.7.3. Otros componentes: C3, C4.....	185
7. CONCLUSIONES.....	187
7.1. Sección I: epidemiología.....	189
7.2. Sección II: inmunología	190
ANEXOS	191
Bibliografía.....	205

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

La MG autoinmune presenta una incidencia anual entre 2 y 21 pacientes por cada millón de habitantes y año (Vincent et al., 2001; Zhang et al., 2007). La prevalencia actual oscila entre 60 y 150/1.000.000 habitantes según las series. La incidencia y prevalencia de la enfermedad han crecido progresivamente en las últimas décadas, especialmente en la población mayor. Sin embargo, la mortalidad (1/1.000.000) ha permanecido estable (Phillips 2nd et al., 1996; Flackenecker, 2006).

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad autoinmune causada por el fallo en la transmisión neuromuscular produciendo debilidad muscular. Habitualmente es debida a la presencia de anticuerpos frente al receptor de acetilcolina (anti-AChR).

Aunque clásicamente ha sido considerada como paradigma de enfermedad autoinmune humoral mediada por células B (debido a la producción de autoanticuerpos), cada vez se sabe más en relación a los mecanismos de autotolerancia y modulación de estos anticuerpos donde las células T desempeñan un importante papel. Estas células desarrollan sus funciones a través de la síntesis de diferentes mediadores como las citocinas.

Este trabajo pretende revisar los conocimientos actuales inmunológicos sobre la enfermedad focalizando el interés en el entendimiento de la compleja red de citocinas que subyace a los pacientes afectos por la MG y explorar factores inmunológicos hasta ahora no estudiados en MG implicados en la inmunopatogenia de la enfermedad.

La realización del proyecto ha permitido la publicación de 3 artículos en revistas científicas:

Roche JC, Capablo JL, Larrad L, Gervas-Arruga J, Ara JR, Sánchez A, Alarcia R. Increased serum interleukin 17 in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2011;44:278-280.

Roche JC, Capablo JL. In response: does increased serum IL-17 level imply its pathogenic role in myasthenia gravis? *Muscle Nerve* 2011; 45:147-148.

Roche JC, Jarauta L, Artal J, Capablo JL. Aperistaltismo esofágico en un paciente con miastenia gravis con disfagia como síntoma de debut. *Neurología* 2011;26:503-505.

1.2. Epidemiología

La MG autoinmune presenta una incidencia anual entre 2 y 21 pacientes por cada millón de habitantes y año ([Vincent et al., 2001](#); [Zhang et al., 2007](#)). La prevalencia actual oscila entre 60 y 150/1.000.000 habitantes según las series. La incidencia y prevalencia de la enfermedad han crecido progresivamente en las últimas décadas, especialmente en la población mayor. Sin embargo, la mortalidad (1/1.000.000) ha permanecido estable ([Phillips 2nd et al., 1996](#); [Flackenecker, 2006](#)).

Estos cambios epidemiológicos se explican por el incremento en el conocimiento de la enfermedad, mejoras en las técnicas diagnósticas, el aumento de la esperanza de vida debido a la existencia de tratamientos inmunomoduladores más efectivos y al envejecimiento de la población.

La enfermedad presenta un comportamiento bimodal en cuanto a la edad de presentación. El primer pico afecta fundamentalmente a mujeres (en una proporción 3-4:1) entre la tercera y cuarta década de la vida. El segundo de ellos presenta cierta

predisposición hacia los varones apareciendo entre la quinta y sexta década de la vida. En este último subgrupo, los pacientes suelen tener anticuerpos anti-AChR y la presencia de timoma, especialmente en los pacientes mayores de 60 años, es mucho menor (Meyer et al., 2010).

La MG ocular (ver apartado 1.3. *Clínica*) es más prevalente en Asia donde generalmente aparece en niños. En los países asiáticos el 50% de los pacientes con MG debuta antes de los 15 años (Zhang et al., 2007). En los países occidentales la MG ocular afecta sólo a un 15% de los pacientes con esta enfermedad y con un 10% de los pacientes debutando antes de los 18 años.

1.3. Clínica

Los pacientes con MG presentan debilidad fluctuante, no dolorosa, que característicamente empeora con el ejercicio y mejora con el reposo. Puede afectar a los músculos respiratorios, bulbares, de extremidades y oculares.

El 85% de los pacientes debuta con síntomas oculares, como ptosis y diplopía. En los siguientes dos años, muchos de ellos evolucionarán a la forma generalizada de la enfermedad con síntomas como disfagia, disartria, disfonía, debilidad masticatoria, debilidad cervical, de cinturas o extremidades, y síntomas respiratorios (disnea, taquipnea, ortopnea). En el 15% de los pacientes, los síntomas no progresan constituyendo el subgrupo conocido como MG ocular.

La debilidad muscular se alivia con el tratamiento con inhibidores de la acetilcolinesterasa y con tratamientos inmunosupresores como los corticoides,

inmunoglobulinas IV, plasmaféresis, azatioprina, metotrexate, ciclosporina A, ciclofosfamida, tacrolimus, micofenolato mofetil o rituximab entre otros.

La evolución clínica es variable. La mayoría de ellos presentan episodios de empeoramiento que pueden ser desencadenados por infecciones, estrés, trastornos hidroeléctricos (hipocalemia, hipofosfatemia), introducción o incremento rápido de corticoesteroides, anemia, cirugías o medicaciones (ej., aminoglicósidos, penicilamina, succinilcolina, toxina botulínica y cloroquina).

Como hemos mencionado antes, la progresión hacia la máxima gravedad de la enfermedad suele ocurrir en los primeros dos años desde el debut de los síntomas. Las remisiones a largo plazo ocurren en un 15% de los pacientes ([Grob et al., 2008](#)).

1.4. Diagnóstico

Los test diagnósticos en la MG autoinmune pueden clasificarse en tres grupos: test farmacológicos, que pueden realizarse a pie de cama del paciente, electrofisiológicos y serológicos mediante la búsqueda de autoanticuerpos ([Meriggioli et al., 2009](#); [Jacob et al., 2009](#)).

El diagnóstico de MG está basado en una clínica sugestiva (ver apartado *1.3. Clínica*) y compatible asociado a uno o más test diagnósticos de los siguientes:

1.4.1. Farmacológicos

1.4.1.1. Test de edrofonio

El edrofonio (cloruro de edrofonio, test Tensilon®; bromuro de edrofonio, Test Anticude®) es un inhibidor de la acetilcolinesterasa de vida media corta. Dificulta la

degradación de ACh en la unión neuromuscular (UNM), por lo que se incrementa la amplitud y duración del potencial postsináptico (EPP, del inglés *endplate potential*).

El fármaco se administra intravenosamente y permite objetivar la mejora transitoria de signos clínicos de la enfermedad como ptosis, oftalmoplejía o disartria. El empleo de síntomas para evaluar la respuesta puede conllevar falsos positivos. La prueba es recomendable realizarse con doble ciego (evaluador y administrador del fármaco y/o placebo). La sensibilidad del test oscila entre el 70 y el 85% en la MG generalizada. La especificidad no es del 100% pudiendo ser positiva en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía periférica o el síndrome de Eaton-Lambert.

Los efectos adversos de la droga son bradicardia y síncope, aunque habitualmente su aparición no es frecuente. Sin embargo, este test debe realizarse con una adecuada monitorización cardiaca, preparación de atropina y un equipo de reanimación. Debe evitar realizarse en pacientes de edad avanzada.

1.4.1.2. Test de hielo

Es un test exclusivamente indicado para evaluar la mejora (al menos de 2 mm) de la ptosis ocular. No es un test farmacológico. Desde un punto de vista fisiopatológico se considera que el frío (por debajo de los 28°C) mejora la transmisión neuromuscular al disminuir la actividad de la acetilcolinesterasa. Algunos autores apuntan a una mejora en la ptosis como consecuencia del reposo requerido durante la aplicación del frío.

Consiste en colocar hielo sobre el ojo durante 2-5 minutos y evaluar la desaparición de la ptosis. Está indicado en pacientes con ptosis ocular en los que está contraindicado el

uso del test de edrofonio. La sensibilidad del test es del 80-90% con una especificidad cercana al 100%. No hay riesgos asociados al mismo.

Cabe mencionar que aunque el frío es capaz de mejorar la fuerza muscular en pacientes miasténicos, no se recomienda bajar a temperaturas musculares por debajo de 22°C porque conlleva un empeoramiento de la contracción de la fibra muscular, a pesar de que se mejora la transmisión neuromuscular (Simpson, 1960).

Además, recientemente esta técnica se ha sugerido como una herramienta útil con una alta especificidad (95%) y una sensibilidad aceptable (76%) en el diagnóstico de diplopía miasténica (Chatzistefanou et al., 2009). No obstante, la subjetividad de la prueba pone en dudas la utilidad de la misma en la diplopía miasténica, a diferencia de la ptosis ocular (Almeida et al., 2008).

1.4.2. Electrofisiológicos

1.4.2.1. Estimulación nerviosa repetitiva

La estimulación del nervio a baja frecuencia (2-5 Hz) produce un decremento progresivo en la amplitud del potencial de acción muscular. Es considerado positivo cuando el decremento es mayor del 10%. Su sensibilidad es del 75% al 90% en MG generalizada y del 50% en MG ocular. Los músculos más frecuentemente estudiados son el músculo trapecio, deltoides, orbicularis oculis y bíceps.

1.4.2.2. Electromiograma de fibra aislada

La electromiografía de fibra aislada (SFEMG, del inglés *single-fibre electromyography*) consiste en identificar potenciales de acción de fibras musculares individuales. El jitter

neuromuscular mide las fluctuaciones en el tiempo transcurrido para que el PPE (potencial postsináptico excitador, ver apartado 2.1. *Unión neuromuscular*) alcance el potencial de acción muscular, o de otra forma mide la latencia entre el estímulo y la respuesta. Como consecuencia del fracaso de la transmisión neuromuscular en la MG, este tiempo está incrementado. Su sensibilidad es mayor al 95%. Sin embargo, su especificidad es menor debido a que puede aparecer incrementado en otras enfermedades nerviosas o musculares. Además, hay que considerar que la realización de la prueba requiere un mayor habilidad del neurofisiólogo y de la colaboración del paciente, por lo que habitualmente es menos empleada que la estimulación repetitiva.

1.4.3. Inmunológicos

Anti-AChR: los autoanticuerpos frente al receptor de acetilcolina son detectados en el 85% de los pacientes con MG generalizada y en el 50% de los pacientes con MG ocular. Las concentraciones varían entre los pacientes, y no se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. En cambio, los niveles de anti-AChR en pacientes con MG generalizada son mayores comparados con los niveles de los pacientes con MG ocular. La especificidad del test es muy alta, considerándose para muchos autores diagnóstica *per se*.

Anti-MuSK: dependiendo de la zona geográfica, entre el 25 y el 40% de los pacientes seronegativos para anti-AChR presentan en suero anticuerpos frente a MuSK (tirosina kinasa específica del músculo). Es decir, aparecen en un 5-8% de todos los pacientes con MG. Es excepcional su presencia en la MG ocular ([Bennett et al., 2006](#)).

Otros anticuerpos frente al músculo estriado (titina, actina, miosina, receptor de ryanodina, Kv1.4) tienen hasta la fecha una utilidad diagnóstica limitada. Suelen estar asociados con formas más graves de MG (ver apartado 2.2. *Otros autoanticuerpos*).

Cabe resaltar que el tratamiento inmunosupresor puede seronegativizar todos estos autoanticuerpos.

1.4.4. Otras pruebas diagnósticas

Aunque no diagnósticas de la enfermedad, las siguientes pruebas deben ser realizadas en todos los pacientes con sospecha o diagnóstico de MG autoinmune: RMN o TAC torácico para descartar la presencia de un timoma y screening de enfermedad tiroidea.

Se recomienda solicitar serologías para el virus varicela zoster, citomegalovirus (especialmente si se considera tratamiento con ciclofosfamida) y un screening para tuberculosis previo al inicio de tratamiento inmunosupresor ([Houssiau et al., 2002](#)).

1.5. Diagnóstico Diferencial

En el diagnóstico diferencial de MG, hay que considerar:

1.5.1. Miastenia gravis ocular

- Miopatía mitocondrial. Aparición de ptosis gradual. No hay fluctuaciones. La ptosis suele ser simétrica con excepcional presencia de diplopía.

- Distrofia muscular oculofaríngea. Caracterizada por ptosis bilateral de lenta evolución y de inicio tardío (mayores de 45 años). La disfagia y cambios en la voz son síntomas frecuentes. Presenta una herencia autosómica dominante.
- Neoplasia intracraneal. La realización de una prueba de imagen cerebral confirma el diagnóstico.
- Ptosis senil. Causada por desinserción o dehiscencia de la aponeurosis del elevador del párpado.
- Oftalmopatía exoftálmica (oftalmopatía de Graves). Exoftalmos y debilidad de musculatura extraocular asociado en ocasiones a dolor ocular. Síntomas hipertiroideos sugieren y las hormonas tiroideas confirman el diagnóstico.
- Disfunción nerviosa simpática. Consecuencia de la denervación del músculo de Müller. La respuesta con nitrato de nafazolina, una droga simpática, orienta el diagnóstico junto con la ausencia de otros signos neurológicos y descartadas otras patologías (Tomelleri et al., 2007).

1.5.2. Miastenia gravis generalizada

- Enfermedad de motoneurona. La presencia de signos de primera motoneurona como reflejos de estiramiento muscular vivos junto con signos de segunda motoneurona como atrofia muscular y fasciculaciones sugieren esta posibilidad. El EMG puede orientar el diagnóstico.
- Mielopatía cervical. Habitualmente la clínica es subaguda. La alteración esfintereana y la presencia de un nivel sensitivo orientan al diagnóstico. La realización de RMN cervical confirma el diagnóstico.

- Distrofia muscular oculofaríngea. (Ver apartado *1.5.1. Miastenia gravis ocular*).
- Síndrome de Guillain-Barré. Clínicamente se manifiesta como debilidad progresiva ascendente con síntomas sensitivos distales y ausencia de reflejos de estiramiento muscular. La disociación albuminocitológica en el LCR y los hallazgos de desmielinización en los estudios de conducción nerviosa confirman el diagnóstico.
- Miopatías. Diferentes enfermedades musculares deben considerarse en el diagnóstico diferencial de MG (ej., deficiencia de mioadenilato que puede producir fatiga pero no afecta a músculos bucofaríngeos, polimiopatía por nemalina causando paresia ocular, polimiositis y miopatías por cuerpos de inclusión, en los que no hay afectación ocular). La determinación de CK orienta el diagnóstico, pese que hay que considerar que hasta en un 10% de los pacientes con MG pueden estar elevados de forma leve.
- Botulismo. Debilidad progresiva descendente con afectación pupilar y autonómica.
- Síndrome miasténico de Eaton-Lambert. Afecta fundamentalmente a musculatura proximal de extremidades inferiores junto con disfunción del sistema nervioso autónomo con rara afectación de musculatura extraocular, facial y bulbar. La presencia de anticuerpos contra los canales de calcio voltaje dependientes confirma el diagnóstico.
- Síndromes miasténicos congénitos. Debut en la infancia o juventud. No hay respuesta al tratamiento inmunosupresor.

- Intoxicación con organofosforados. Algunos insecticidas se unen irreversiblemente a la acetilcolinesterasa que conduce a una despolarización permanente de la placa motora, haciéndose refractaria al estímulo nervioso.

1.6. Tratamiento

1.6.1. Sintomáticos: inhibidores de la colinesterasa

La piridostigmina es el más utilizado. Al inhibir la acción de la acetilcolinesterasa, se aumenta la disponibilidad de la ACh en la placa motora. No se deben sobrepasar dosis de 450 mg/día por riesgo de crisis muscarínica. La dosis eficaz en la mayoría de los pacientes oscila entre 180 y 240 mg/día. Sus efectos adversos más frecuentes son la diarrea, los espasmos abdominales, urgencia de esfínteres, bradicardia, bloque A-V, hipersalivación, lacrimo y sudoración. Todos estos efectos son muscarínicos. Sin embargo, los efectos nicotínicos como calambres musculares o las fasciculaciones son menos frecuentes. Está indicada en pacientes con síntomas leves o con MG ocular. Su administración no modifica el curso evolutivo de la enfermedad. Como consecuencia de consideraciones éticas la eficacia de este fármaco está sólo avalada por estudios observacionales (Skeie et al., 2010). El empleo de estos fármacos en la MG con anti-MuSK debería realizarse con precaución como consecuencia de la hipersensibilidad a la ACh en estos pacientes (Punga et al., 2006).

Otros inhibidores de la colinesterasa como la neostigmina (Prostigmina®) son menos utilizados debido a su peor farmacodinamia y tolerancia.

1.6.2. Inmunomodulares de corto alcance

Se deben considerar en las exacerbaciones, crisis miasténicas, como medicación pre-timectomía y en casos refractorios a tratamientos inmunosupresores. Tanto las

inmunoglobulinas como la plasmaféresis tienen una eficacia similar ([Gajdos et al., 2008](#)).

1.6.2.1. Inmunoglobulinas IV

Su mecanismo de acción no está claro (probablemente al competir con los autoanticuerpos y al unirse a la fracción Fc de los mismos). La dosis habitual es de 0.4g/Kg/día durante 5 días. El efecto aparece entre la primera y segunda semana y puede durar hasta 3 meses. Es el tratamiento más frecuentemente empleado en las exacerbaciones. Otras indicaciones son la preparación prequirúrgica previa a la timectomía o en casos de MG refractaria al tratamiento inmunosupresor. Otra posible indicación sería la de prevenir la exacerbación secundaria a corticoides en pacientes con debilidad orofaríngea o de musculatura respiratoria. Suelen ser bien toleradas y la cefalea, fiebre o rash son los efectos adversos más frecuentes relacionados con la infusión. Complicaciones más excepcionales son la meningitis aséptica, fracaso renal o fenómenos trombóticos ([Skeie et al., 2010](#)).

1.6.2.2. Plasmaféresis

Su acción consiste en eliminar los autoanticuerpos presentes en el suero del paciente. La pauta habitual es el intercambio de 2-5 litros de plasma al día durante 4-6 días, desarrollados en días seguidos o alternos. La eficacia es similar a las inmunoglobulinas IV (IgIV), pero con una mayor rapidez de acción. Las indicaciones son similares a las de la IgIV. Sus efectos adversos más frecuentes son las parestesias y la hipotensión. Los potenciales efectos adversos (especialmente complicaciones trombóticas, infecciones y

riesgo de sangrado), el coste y disponibilidad son las principales desventajas (Skeie et al., 2010).

En las exacerbaciones de la enfermedad hay que valorar la debilidad de la musculatura bulbar y valorar el uso de apoyo ventilatorio incluida, en ocasiones, la ventilación mecánica invasiva. Debe considerarse la alimentación por boca y el uso de sondas nasogástricas de alimentación para evitar el riesgo de aspiraciones.

1.6.3. Inmunomoduladores de mantenimiento

1.6.3.1. Corticoesteroides

Los corticoesteroides por vía oral son considerados el tratamiento de elección a largo plazo de la MG a pesar de no existir estudios controlados (Skeie et al., 2010). Su mecanismo de acción se debe fundamentalmente a la inhibición, proliferación y redistribución de linfocitos, cambios en la expresión de citocinas y a la inhibición de la acción de macrófagos. El tratamiento inicial con altas dosis de corticoesteroides puede producir un empeoramiento transitorio, hasta en el 30% de los pacientes, que aparece en los primeros 10 días. Por esta razón se recomienda un incremento gradual de la dosis. La dosis recomendada en la MG generalizada es de 10 mg a días alternos, incrementando 10 mg cada semana hasta un total de 1.5 mg/Kg (máximo 100 mg/día) o antes si hay control sintomático. En la MG ocular se recomienda comenzar con 5 mg a días alternos, incrementando 5 mg cada semana hasta un total de 0.75 mg/Kg (máximo 60 mg/día) o antes si hay control de síntomas. El tratamiento a altas dosis se mantiene varios meses y posteriormente se reduce de manera progresiva. Otros autores proponen dosis altas de corticoesteroides de inicio. La eficacia de los corticoesteroides es superior

al 80%. Los efectos adversos más frecuentes son: trastornos del sueño, de ánimo, incremento de peso, dispepsia, acné o dermatitis, visión borrosa, y a largo plazo: úlcera péptica, osteoporosis, diabetes mellitus, hipertensión, infecciones, miopatía proximal, características cushingoides. Cuando se administran deben prescribirse al mismo tiempo inhibidores de la bomba de potasio y protectores de la mineralización ósea como vitamina D, bifosfonatos y calcio (Saag, 2004).

Como consecuencia de los potenciales efectos adversos de los corticoesteroides, otros fármacos inmunosupresores deben ser considerados (“ahorradores de esteroides”) para reducir la dosis o retirar los corticoesteroides.

1.6.3.2. Azatioprina

Este fármaco suprime la síntesis de purinas inhibiendo la síntesis de ADN y la proliferación de células B y T. Es considerado el fármaco de elección para reducir la dosis de esteroides. Un estudio doble ciego y aleatorizado apoya su eficacia clínica como reductor de dosis de corticoides (Palace et al., 1998). La dosis utilizada es de 2-3 mg/kg/día. Su principal inconveniente es el largo tiempo, hasta 18 meses, en producir beneficio. Por esta razón suele administrarse junto a corticoesteroides inicialmente. Suele ser bien tolerado aunque en un 10-20% de los pacientes puede aparecer un síndrome pseudogripal que aparece en las dos semanas del inicio de la medicación. Los efectos secundarios más graves son la hepatotoxicidad, pancreatitis, leucopenia (dependiente de la dosis) y riesgo a largo plazo de neoplasia (especialmente linfoma, relacionado con la dosis y la duración del tratamiento). La azatioprina es metabolizada por la tiopurina metiltransferasa (TPMT, del inglés *thiopurine methyltransferase*). La actividad enzimática debe por tanto medirse en todos los pacientes para evitar riesgo de

toxicidad. Un 11% de la población son heterocigotos y un 0.3% homocigotos para mutaciones en el gen.

1.6.3.3. Metotrexate

Es un antagonista del ácido fólico que inhibe la síntesis de las purinas y como consecuencia impide la proliferación de los linfocitos B y T. A pesar de no haber muchos estudios sobre el papel del metotrexate en MG, es ampliamente usado en pacientes que no responden a la azatioprina, como terapia de segunda línea. Hasta hace poco tiempo, el uso de metotrexate en MG era debido al efecto conocido en otras condiciones autoinmunes y ser recomendado por expertos en MG. Recientemente, un ensayo clínico que comparaba la eficacia de metotrexate frente a azatioprina ha demostrado una eficacia y tolerancia similar ([Heckmann et al., 2011](#)), donde el objetivo primario era la dosis de corticoesteroides requerida. La dosis empleada era de 17.5mg semanales. Los efectos secundarios más frecuentes son la elevación de enzimas hepáticas, alopecia, trastornos intestinales y mucositis. Complicaciones más graves como neumonitis, mielosupresión o hepatotoxicidad son menos habituales.

1.6.3.4. Micofenolato mofetil.

Su acción consiste en bloquear la síntesis de purinas. Como consecuencia suprime la proliferación de las células B y T. Su eficacia clínica está basada en series de casos o estudios abiertos aunque dos ensayos clínicos controlados en que comparaban en pacientes corticodependientes micofenolato frente placebo no demostraron beneficio adicional del fármaco. Pese a esto es considerado la tercera línea de tratamiento dado la buena tolerabilidad y la escasa frecuencia de efectos adversos medicamentosos ([Skeie et](#)

al., 2010). Estos efectos incluyen fracaso renal crónico, linfoma primario del sistema nervioso central, infección por el virus del Nilo occidental, depresión o erupciones cutáneas psoriásicas. La dispepsia es uno de los efectos secundarios más frecuentes. Su complicación más seria es la mielosupresión cuyo riesgo se incrementa con dosis superiores a 3000 mg. La dosis habitual es de 1500 mg a 3000 mg dividida en dos dosis. (Heatwole, Ciafaloni, 2008).

1.6.3.5. Ciclosporina

Inhibe la señal de calcineurina, bloqueando la síntesis de IL-2 inhibiendo la función de las células T. Varios estudios no controlados y ensayos clínicos apoyan su uso en un pequeño número de pacientes con MG (Tindall et al., 1993). La dosis de inicio es de 5mg/kg al día y la dosis habitual de mantenimiento es de 3-4 mg/kg dos veces diarias. El objetivo es alcanzar niveles en sangre entre 100 y 150 µg/L. Los efectos secundarios más frecuentes son el temblor, hirsutismo, síntomas pseudogripales, mialgias, anemia e hiperplasia gingival. Las complicaciones más graves que limitan su uso son la hipertensión, nefrotoxicidad y riesgo potencial de neoplasias (Skeie et al., 2010).

1.6.3.6. Tacrolimus (FK506)

Tiene un efecto similar a la ciclosporina. Su beneficio clínico es apoyado por un estudio aleatorizado, no ciego y series de casos. Informes previos sugieren beneficio en pacientes con anticuerpos frente al receptor de rianodina (RyR), sugiriendo que Tacrolimus favorece la liberación de calcio sarcoplásmico relacionado con el receptor de rianodina (Minami et al., 2011). La dosis habitual es de 3 a 5 mg diarios. Es menos nefrotóxico que la ciclosporina.

1.6.3.7. Ciclofosfamida

Es un agente alquilante que actúa sobre el ADN inhibiendo la proliferación celular. Dado sus potenciales efectos secundarios graves (mielosupresión, cistitis hemorrágica, infecciones y riesgo de malignidad), es reservado para pacientes con MG refractaria (De Feo, 2002). La dosis habitual son pulsos intravenosos u orales (500 mg/m²). Otros efectos secundarios más frecuentes y leves son náuseas, vómitos, diarrea, alopecia.

1.6.3.8. Rituximab

Es un anticuerpo monoclonal anti-CD20. Produce una depleción de los linfocitos B. Es administrado cada 4 meses. Se ha utilizado en pacientes con MG refractaria al tratamiento, especialmente pacientes con anticuerpos anti-MuSK en suero. El coste económico es uno de sus principales desventajas. Entre las complicaciones más frecuentes son aquellas relacionadas con la infusión como fiebre, náuseas, vómitos, flush o broncoespasmo. Complicaciones más graves como neumonitis, mielosupresión o riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva son menos frecuentes (Benveniste, Hilton-Jones, 2010).

1.6.3.9. Otros inmunomoduladores

El uso de etanercept, receptor soluble de TNF- α , ha sido empleado con beneficio en series de pacientes con MG (Rowin et al., 2004). Inhibidores del complemento como el REV576 o el anti-C5, eculizumab, están actualmente en evaluación en ensayos clínicos dado los beneficios obtenidos en animales de experimentación (Soltys et al., 2009).

1.6.4. Timectomía

Un 10% de los pacientes con MG tienen asociado un timoma, y a la inversa, el 50% de los timomas están asociados con MG. En todo paciente con timoma se debe proceder a la extirpación de la tumoración. El abordaje transesternal o la videotoracoscopia obtienen los mismos resultados. Hay que resaltar que la excisión del tumor no conlleva a la curación de la enfermedad autoinmune, por lo que el seguimiento y el tratamiento farmacológico inmunosupresor deben continuar. Además, el tratamiento prequirúrgico debe incluir IgIV o plasmaféresis para evitar exacerbaciones o crisis postimectomías. No hay evidencias sobre cuál de estos dos tratamientos es el de elección. En caso de riesgo de fracaso cardiopulmonar hay que optar por la infusión de inmunoglobulinas para evitar sobrecarga de volumen.

En pacientes sin timoma, la timectomía estaría indicada en pacientes con MG generalizada, debut precoz (menores de 50, o en todo caso menores de 60-65) y con anti-AChR. También se recomienda que en estos casos la intervención se realice de forma precoz en la evolución de la enfermedad, preferiblemente en los tres primeros años desde el diagnóstico ([Skeie et al., 2010](#); [Gronseth, Barohn, 2000](#)).

Análisis retrospectivos muestran la ausencia de eficacia de timectomía en pacientes con anti-MuSK ([Okumura et al., 2010](#)).

El papel de la timectomía en pacientes seronegativos es controvertido ([Skeie et al., 2010](#)).

2. INMUNOPATOGENIA EN MIASTENIA GRAVIS

2.1. Unión neuromuscular

La unión neuromuscular o placa motora es una sinapsis especializada diseñada para transmitir el impulso nervioso procedente del nervio motor al músculo. La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor fundamental en esta transmisión.

Los axones de las neuronas motoras α procedentes de las astas ventrales de la médula espinal y del tronco del encéfalo terminan ramificándose distalmente para alcanzar las fibras musculares individuales, formando estructuras conocidas como unión neuromuscular. Inicialmente, los axones están recubiertos de mielina formando los nervios periféricos, y conforme se alejan distalmente el grosor del nervio disminuye y la envoltura de mielina va desapareciendo. Finalmente, el terminal nervioso presináptico es amielínico.

En los botones presinápticos se encuentran las vesículas sinápticas cargadas de ACh. Entre el botón presináptico axonal y la superficie muscular existe un espacio, la hendidura sináptica, de unos 20nm que contiene acetilcolinesterasa encargada de escindir la ACh.

La membrana muscular, o postsináptica, tiene profundos pliegues en los que numerosos receptores de ACh (AChR) están inmersos (12.000 moléculas de AChR/ μm^2). En el anclaje de estos receptores es fundamental la presencia de otras proteínas como MuSK, rapsina y DOK-7 (Contil-Fine et al., 2006).

Cuando el potencial de acción nervioso alcanza el botón nervioso, se abren canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (VGCC, del inglés *voltage-gated calcium channels*), conduciendo a un incremento transitorio de la concentración de calcio intracelular, que desencadena la fusión de las vesículas presinápticas con la membrana presináptica. De esta forma, se libera el contenido de las vesículas (ACh) a la hendidura sináptica. La

ACh, que puede ser hidrolizada por acetilcolinesterasa, alcanza finalmente el AChR de la membrana postsináptica (muscular) que desencadena la entrada de Na^+ en la fibra muscular. Cuando el umbral de despolarización es alcanzado (potencial de placa terminal, PPE) se activan los canales de Na^+ voltaje dependientes conduciendo a más influjo de Na^+ y diseminando el potencial de acción a través de la fibra muscular. Este potencial de acción muscular conlleva la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico que se une a la troponina C con la consiguiente contracción muscular mediada por los filamentos de actina y miosina.

El PPE es mucho mayor que el umbral necesario para desencadenar un potencial muscular de acción positivo. Esto es considerado un mecanismo protector. De hecho, se considera que se necesita una pérdida del 60% de los AChR para producir un fallo de la neurotransmisión, tanto en la MG autoinmune como congénita.

Mientras todo esto ocurre, en el terminal presináptico, los canales de potasio voltaje dependientes (VGKC, del inglés *voltaje-gated potassium channels*), se abren para restaurar el potencial de membrana de reposo (Lange et al., 2003). La acción de la acetilcolinesterasa también contribuye para que esto suceda.

En la membrana postsináptica, además del AChR, existen otras proteínas implicadas en la correcta transmisión neuromuscular como la rapsina, MuSK y agrina. Tanto la agrina como la proteína MuSK son imprescindibles para el correcto funcionamiento de la transmisión neuromuscular. Así, ratones genéticamente ausentes de alguna de estas dos proteínas mueren al nacimiento por grave debilidad muscular aunque los AChR y otras proteínas estén correctamente desarrollados (Sanes, Lichtman, 2001; Gautam et al., 1996).

El receptor de ACh (AChR) es una proteína formada por 5 subunidades: α_2 , β , γ y δ en el músculo denervado y en el embrión; α_2 , β , δ y ϵ en el adulto (Vincent, 2006). De manera interesante, músculos adultos como la musculatura extraocular todavía expresan AChR de tipo embrionario. La mayoría de los anti-AChR están dirigidos frente a la región inmunogénica principal (MIR, del inglés *main immunogenic region*) en las subunidades α . Sin embargo, muchos pacientes tienen anticuerpos dirigidos específicos para la forma fetal del AChR, por lo que deben unirse a la subunidad γ . Estos antígenos con AChR fetales tendrían que expresarse también en las células mioideas (ver sección 2.11. Timo) (Vincent, 2006).

Los anti-AChR son muy variables en sus cadenas ligeras y subclases de IgGs. En cambio, son muy específicos y tienen una alta afinidad para el AChR. Esto sugiere que alguna molécula nativa AChR induce estos anticuerpos (Vincent et al., 1998). La mayoría de estos autoanticuerpos son de clase IgG1 o IgG3, capaces de activar el sistema del complemento de manera eficaz.

Cualquier factor que afecte a alguno de los pasos descritos anteriormente conduce a un fracaso en la eficiencia de la transmisión entre el nervio y el músculo. Pueden existir defectos genéticos (ej. síndromes miasténicos congénitos), factores ambientales (ej. tóxicos), pero el objetivo de este trabajo es el estudio del fracaso de la unión neuromuscular causada por autoanticuerpos circulantes.

Anticuerpos contra diferentes componentes del músculo estriado (componentes citoplasmáticos), como la titina, miosina, el receptor de ryanodina son detectados en muchos pacientes con MG (alrededor del 80% de los pacientes) asociado con timoma (Romi et al., 2002). Sin embargo, el significado patogénico de estos autoanticuerpos dirigidos contra proteínas intracelulares es cuestionable, aunque parece que tengan

alguna utilidad como indicador de presencia de timoma. Pero también muchos pacientes mayores con MG sin timoma tienen también estos anticuerpos (Buckley et al., 2001). Estos autoanticuerpos están asociados a formas más graves de MG (ver apartado 2.4. *Otros autoanticuerpos*).

2.2. Miastenia gravis como enfermedad autoinmune

La MG es un prototipo de enfermedad mediada por autoanticuerpos. El 85% de los pacientes con MG generalizada presenta en sangre anticuerpos frente al receptor nicotínico de ACh (anti-AChR) de los músculos estriados. En los pacientes con MG ocular, el porcentaje baja al 50% (Vincent, 2006). Además, estos pacientes con MG ocular suelen tener títulos de anticuerpos no tan elevados comparados con pacientes con MG generalizada. Los anti-AChR son, fundamentalmente, IgG1 e IgG3 capaces de activar el complemento.

La MG cumple los criterios de enfermedad autoinmune:

- 1) Los anticuerpos se han encontrado en el lugar de la lesión (la unión neuromuscular).
- 2) Las inmunoglobulinas de pacientes con MG o los anti-AChR de animales de experimentación producen síntomas miasténicos al ser inoculados en roedores.
- 3) La inmunización en animales con AChR reproduce los síntomas de la enfermedad.
- 4) Las terapias que disminuyen los niveles de anticuerpos en sangre (ej. plasmaféresis) disminuyen la sintomatología (Conti-Fine et al., 2006).

Los anti-AChR en la MG alteran la transmisión neuromuscular por tres mecanismos:

- 1) Bloqueo funcional de los receptores de ACh.
- 2) Uniéndose al antígeno y activando al complemento que conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y la posterior destrucción de receptores. Esto produce una distorsión de la membrana postsináptica reduciendo el número de pliegues (disminuyendo también el número de canales de Na^+ voltaje dependientes).
- 3) Aceleran la degradación de los AChR uniéndose a dos antígenos (AChR) conduciendo a una lesión celular que activa la degradación del mismo que sobrepasa la capacidad de síntesis, en un mecanismo conocido como modulación antigénica.

De estos tres mecanismos, el daño tisular secundario a la activación del complemento es considerado la lesión primaria en la MG.

2.3. Miastenia gravis seronegativa

El 15% de los pacientes con MG generalizada y el 50% con MG ocular no presentan en suero anti-AChR detectables. Sin embargo, estos pacientes responden bien al tratamiento con plasmaféresis, y la inoculación de las inmunoglobulinas de estos pacientes a animales de experimentación induce en ellos sintomatología miasténica. Esto sugiere la implicación de factores humorales en la patogénesis de la MG seronegativa (Vincent, 2006). Recientemente, se ha detectado en un 66% de los pacientes con MG seronegativa la presencia de anti-AChR de baja afinidad que no son capaces de detectarse en los análisis actuales pero sí son capaces de unirse al AChR anclado en cultivos celulares (Leite et al., 2008).

Por otra parte, hasta el 40% de los pacientes seronegativos para anti-AChR presentan en suero anti-MuSK (Hoch et al., 2001). Estos anticuerpos son predominantemente de tipo

IgG4, que no son capaces de activar el complemento. Histológicamente no se detecta la formación del complejo de ataque de membrana del complemento, ni fagocitosis de los AChR. Clínicamente, estos pacientes suelen tener una frecuencia más alta de afectación bulbar y crisis respiratoria. Además, suelen tener algunas características atípicas como una más marcada atrofia facial. Estos pacientes suelen tener un debut más precoz, con predominancia hacia las mujeres. La alteración del timo es normal o casi normal comparada con controles (Meyer et al., 2010). Desde un punto de vista geoepidemiológico, países con latitudes más altas como Noruega, Reino Unido, Holanda o Dinamarca presentan una proporción de pacientes relativamente baja, del 0 al 25% dependiendo de las series, de pacientes serogenativos (para anti-AChR) con anti-MuSK en suero. En cambio, regiones mediterráneas como España presentan tasas de hasta el 40% de pacientes con anti-MuSK entre el subgrupo de pacientes seronegativos (para anti-AChR) (Vincent et al., 2005).

En cambio, los pacientes seronegativos para ambos anticuerpos presentan un comportamiento más benigno con respecto al grupo anti-MuSK positivo y anti-AChR positivo (Deymeer et al., 2007). Probablemente, su prevalencia real es mayor que la informada en estudios.

2.4. Otros autoanticuerpos

Muchos pacientes con MG presentan autoanticuerpos capaces de unirse mediante un mecanismo de reacción cruzada con tejidos musculares cardíacos y esqueléticos. Son conocidos como autoanticuerpos contra el músculo estriado (intrigante considerando la MG una enfermedad de placa motora). Son autoanticuerpos frente a la actina, miosina, ryanodina, titina o Kv1.4 y otros menos estudiados como actinina o filamina. Aparecen

en un 80% de los pacientes con MG asociado a timoma y en un 30% de los pacientes con MG no asociado a timoma (Conti-Fine et al., 2006). Su implicación patogénica no está clara.

En concreto, pacientes con anticuerpos contra la titina, el receptor de ryanodina (RyR, del inglés *ryanodine receptor*) y Kv1.4 aparecen en suero de pacientes con timoma, debut tardío y formas más graves de MG.

El receptor de ryanodina (565 kD) es un canal liberador de calcio del retículo sarcoplásmico. Así, los anticuerpos RyR reconocen la región N-terminal de RyR encargada de la regulación del canal, e inhiben la liberación de Ca^{2+} in vitro. Sin embargo en vivo no existe evidencia suficiente (Huang, Tan, 2010). Molecularmente son diferentes en el músculo cardíaco (RyR2) que esquelético (RyR1). Sin embargo, se ha demostrado reacción cruzada con autoanticuerpos de pacientes con anti-RyR. 4 subunidades forman el canal mencionado anteriormente. Existe asociación de miositis y miocarditis. Aparece en pacientes con MG ocular de debut tardío. El tacrolimus presenta un beneficio clínico precoz en estos pacientes. Además, la presencia de anticuerpos frente al receptor de ryanodina se relaciona con debilidad cervical, bulbar y de musculatura respiratoria, distribución de síntomas de MG sin afectar a extremidades (Romi et al., 2007).

Los canales de potasio voltaje dependientes (VGKC) están formados por cuatro subunidades α transmembrana que se combinan en forma de homo o hetero-tetrámeros. Kv1.4 es una subunidad α (73 kD) que se expresa en cerebro, nervios periféricos, músculo esquelético y cardíaco (Suzuki et al., 2011). Está asociado a riesgo de arritmias letales y miocarditis autoinmune. Se recomienda tratamiento con inhibidores de la calcineurina (Suzuki et al., 2011) como ciclosporina o tacrolimus.

La titina es una proteína de gran peso molecular (3000 kD) que se encuentra en el sarcómero muscular cardíaco o esquelético. Es un muelle molecular dependiente del Ca^{2+} que se adapta al estado fisiológico de la célula muscular, encargada de la estabilidad celular.

¿Cuál es la utilidad de estos autoanticuerpos en MG? En una fase pre-diagnóstica la utilidad es casi nula, considerando que todos ellos aparecen en pacientes seropositivos (para anti-AChR). En cambio, podrían existir dos utilidades prácticas en la fase post-diagnóstica: i) screening para timomas: el uso de la determinación de titina y ryanodina presentan conjuntamente una sensibilidad y especificidad del 95%, con un valor predictivo negativo para timoma del 99% en pacientes con MG de debut precoz. El uso del TAC torácico presenta una sensibilidad sólo del 73% con un valor predictivo negativo del 65%; ii) selección de inmunosupresores: como hemos visto antes los inhibidores de calcineurina (tacrolimus, ciclosporina) podrían presentar un beneficio mayor en pacientes seropositivos para anti-RyR y anti-Kv1.4 (Romi et al., 2005).

2.5. Anticuerpos frente al AChR

La α -Bungarotoxina (α -BuTx) es una toxina derivada del veneno de serpiente. Es capaz de unirse irreversiblemente al AChR. Esta toxina puede etiquetarse mediante elementos radiactivos como el ^{125}I y usarse para detectar la presencia de anticuerpos anti-AChR.

Los AChR, extraídos de músculos de mamíferos, son etiquetados con ^{125}I - α -BuTx. Posteriormente, suero del paciente es añadido produciéndose con las IgG un inmunoprecipitado capaz de detectarse y medirse.

2.6. Linfocitos B

La respuesta inmunitaria humoral está mediada por la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Los linfocitos B surgen en la médula ósea de las células madre hematopoyéticas primordiales pluripotenciales. Ahí maduran en una fase independiente del antígeno pasando por diferentes fases: células pro-B, células pre-B y células B inmaduras. Este proceso es dependiente de las células del estroma de la médula ósea (fibroblastos, células endoteliales y adipocitos). En la médula ósea las células B expresan inmunoglobulinas (Ig) mediante procesos aleatorios recombinando las cadenas pesadas y ligeras. Al ser un proceso estocástico pueden producirse Ig que reconozcan antígenos propios. Existen mecanismos capaces de eliminar estas células B autorreactivas, en un proceso conocido como tolerancia negativa.

Posteriormente, entran en una fase antígeno-dependiente al ser estimuladas por antígenos. Esta segunda fase ocurre en los tejidos linfoides periféricos. Aquí, estas células maduran, se activan y, a través de una fase de plasmoblastos, se convierten finalmente en células plasmáticas productoras de anticuerpos ([Martin and Chan, 2006](#); [Dalakas, 2008](#)).

El porcentaje de linfocitos B en sangre de pacientes con MG es la misma comparada con controles sanos. Sin embargo, la frecuencia de LB que expresan CD71 es significativamente mayor, especialmente en pacientes seropositivos ([Ragheb et al., 1999](#)). Este marcador, es un receptor de transferrina, esencial para el transporte de hierro para la proliferación de celular. Esto sugiere que en pacientes con MG existe una mayor proporción de LB en proliferación.

Todas las personas producen LB autorreactivas contra sí mismas. Afortunadamente, estas células están en un equilibrio controlado por mecanismos de selección negativa y

tolerancia periférica (Schlomchik et al., 2001). La selección negativa consiste en la apoptosis, que conlleva la eliminación de las células B, en el caso de que se reconozcan antígenos de la superficie celular (ej. moléculas del sistema ABO) y anergia, que conlleva la inactivación de las células B, si éstas reconocen antígenos pequeños solubles. La tolerancia periférica está mediada por linfocitos T helper debido a la ausencia de Th autorreactivos que colaboren con las células B. De esta manera, el fallo de estos mecanismos conduce a la producción de anticuerpos con antígenos del propio organismo y el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como la MG (Yurasov et al., 2005).

Los mecanismos patogénicos de los linfocitos B en la MG se pueden clasificar en 3 tipos:

- 1) Producción de anticuerpos: pueden unirse al AChR y activar el sistema del complemento (lesión primaria en la MG como ya hemos mencionado anteriormente) o unirse a los receptores Fc de macrófagos, neutrófilos y células NK para producir una lesión citotóxica.
- 2) Presentación de antígenos: los LB son células presentadoras de antígenos, que activan a los LT para la perpetuación y potenciación de la respuesta inmune.
- 3) Producción de citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-16, IL-23, TNF- α , IFN- γ que alteran la inmunorregulación de los LT y activan a los macrófagos (Dalakas, 2008).

Dos miembros de la familia TNF- α , BAFF y APRIL, desempeñan un importante papel en la supervivencia y diferenciación de los LB. Son producidos por macrófagos, monocitos y células dendríticas. Circulan en forma trimérica y se unen a los LB a través

de tres receptores: BAFF-R, BCMA y TACI (Kalled, 2006; Peter and Warnatz, 2005).

Recientemente, numerosas publicaciones están focalizadas en determinar la influencia de estos mediadores en la MG.

En resumen, la ausencia de correctos mecanismos de autorregulación en los pacientes con MG produce la activación y proliferación de los LB específicos productores de anti-AChR. Y es aquí donde las células T helper (LTh, del inglés *LT helper* o colaboradoras) desempeñan una función reguladora en condiciones normales.

2.7. Subpoblaciones de Linfocitos T helper

Los linfocitos T proceden de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales de la médula ósea. Las células T maduran en el timo. Pero es en los órganos linfoides secundarios donde se activan al interactuar con las células presentadoras de antígeno mediante el reconocimiento del complejo péptido/MHC con el receptor del linfocito T (TCR). Esto conduce a una expansión clonal de los linfocitos T específicos de antígeno.

Estos linfocitos T se transforman en diferentes subtipos de células efectoras.

La producción de anticuerpos en la MG es producida por las células B regulados por las células Th (Brocke et al., 1988; Harcourt et al., 1988). Los anti-AChR patogénicos son inmunoglobulinas altamente específicas. Sin embargo, los anti-AChR de baja afinidad son frecuentes en condiciones normales. Hasta un 10% de los pacientes con mieloma IgG presenta en suero este tipo de autoanticuerpos. Posiblemente, al ser autoanticuerpos de baja afinidad la patología (MG) es excepcional (Eng et al., 1987).

La interacción de las células Th con las células B es la que desencadena mutaciones somáticas que conducen a modificaciones de los genes de Ig con la aparición de los patogénicos anti-AChR altamente específicos.

El papel de las células Th en la patogénesis está apoyado por diferentes hechos como por ejemplo que pacientes con VIH mejoran la sintomatología al reducir el número de células CD4 (Nath et al., 1990). Además, ratones de experimentación en los que se les inocula linfocitos sanguíneos procedentes de suero de pacientes con MG desarrollan la enfermedad sólo si este injerto contiene células T CD4⁺ (Wang, 1999). Estas células Th se pueden clasificar en 4 subgrupos dependiendo del perfil de citocinas (y no por las moléculas que expresan en su superficie) que producen:

2.7.1. LTh1.

Secretan citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α y TNF- β . Estas citocinas son las encargadas de dirigir la respuesta inflamatoria celular incluyendo la activación de macrófagos. Además, son altamente efectivas en la eliminación de organismos intracelulares (Hsieh et al., 1993; Scharon and Scott, 1993). Las células Th1, estimuladas por IL-12, expresan t-bet como factor de transcripción linaje-específico (El-behi et al, 2010).

2.7.2. LTh2.

Secretan citocinas anti-inflamatorias y estimuladoras de los LB como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Están implicadas en diferentes procesos inflamatorios. Son potentes estimuladores de la respuesta inflamatoria humoral (Mosmann et al., 1986). Son

importantes para la producción de IgE y para la eliminación de organismos extracelulares (Min, Prout and Hu-Li, 2004; Shinkai, Mohrs and Locksley, 2002; Bottomly, 1988). También pueden inhibir ciertos fenómenos autoinmunitarios. Las citocinas dependientes de las células Th2, a diferencia de las dependientes de las células Th1, tienen un papel más complejo y su implicación en la EAMG es más confusa. Estas células Th2 expresan GATA3 como factor de transcripción linaje-específico (El-behi et al., 2010) y son estimuladas en respuesta a IL-4. En general, se asume que IL-4 e IL-6 son potentes estimuladores de las células B. Esto sugeriría un papel importante en EAMG (Nagvekar et al., 1998; Cohen-Kaminsky et al., 1993). Sin embargo, un estudio demostró que ratones IL-4^{-/-} (deficientes de esta citocina) desarrollaban la enfermedad con un comportamiento similar a ratones IL-4^{+/+}, por lo que la implicación de IL-4 no es requerida para el desarrollo de la EAMG (Balasa et al., 1998). Además, IL-4 estimula la diferenciación de las células Th3.

Las células Th1 y Th2 participan en la síntesis de anticuerpos, pero cada una de estas poblaciones lo hace con diferentes tipos de Ig. En animales, y se piensa que en humanos también, las células Th1 inducen subclases de IgG capaces de activar el sistema del complemento. En cambio, las células Th2 inducen otros isotipos de Ig y subclases de IgG que no fijan el complemento o lo hacen de manera poco eficaz (Saoudi et al., 1999). Con respecto a este punto, cabe mencionar que los anti-AChR son fundamentalmente IgG1 e IgG3 capaces de activar el complemento a diferencia de los anti-MuSK.

El desequilibrio entre las células Th1 y Th2 está relacionado con la inducción y desarrollo de diferentes enfermedades inmunológicas, entre ellas, la MG (Masuda et al., 2010; Ishida et al., 1994; Rapoport et al., 1994; Racke et al., 1994; Nicholson et al., 1995). Así, los corticoides, utilizados en el tratamiento de la MG, se ha demostrado que

inhibe la producción de IL-12 (que a su vez favorece el desarrollo de las células Th1), mientras que la producción de IL-10 (favoreciendo el desarrollo de las células Th2) no se ve influida por el tratamiento con esteroides (Blotta, DeKruyff and Umetsu, 1997; Ramírez et al., 1996). Es decir, los glucocorticoides desequilibran la relación Th1/Th2 hacia las células Th1 (Wang, Campbell and Young, 1993).

Masuda et al. informaron recientemente que existía una fuerte predominancia de células Th1 en los pacientes con MG, medida a través de procedimientos de detección de citocinas intracelulares en las células CD4⁺ de sangre periférica (Masuda et al., 2010). Además, estos autores informaban que la razón Th1/Th2 en sangre periférica estaba relacionada con la actividad de la enfermedad en aquellos pacientes tratados no sólo con corticoides, sino también con inmunosupresores.

2.7.3. LTh17.

Recientemente, se ha descubierto una nueva subpoblación de células T helper, LTh17. Estas células secretan IL-17 (Fossiez et al., 1996). Otras citocinas dependientes de esta vía son la IL-6, IL-22 y TNF- α . Participan en la respuesta contra patógenos extracelulares y hongos. Si la IL-12 e IL-4 es requerida para la transformación de células CD4⁺ naïve en células Th1 y Th2, respectivamente, TGF- β y IL-6 o IL-21 es requerida para la transformación en Th17. Este proceso está potenciado por TNF- α e IL-1 β (Stockinger, Beldhoen, 2007). Además, IL-23 es necesaria en las fases finales del desarrollo Th17 (McGeachy et al., 2009). Por otro lado, se ha demostrado que la diferenciación de las células Th17 puede ser inhibida por IFN-gamma, IL-27 e IL-2. El ácido retinoico también es capaz de inhibir el desarrollo de estas células.

La combinación de IL-6 y TGF- β induce el receptor nuclear orphan, el receptor orphan relacionado con el retinoide (ROR) γ t y ROR α , que son los factores de transcripción fundamentales en determinar la diferenciación del linaje Th17 (Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2008).

Existen evidencias de que el desarrollo de Th17 en el timo de pacientes con MG no está incrementado. Esto está basado en que el RNAm que codifica RORC es expresado de manera similar en el timo de pacientes con o sin MG (Ivanov et al., 2006; Matsui et al., 2010).

2.7.4. LT reguladores

Son las células T CD4⁺ que expresan el marcador CD25 y el factor de transcripción Foxp3. Este factor Foxp3 es esencial para el desarrollo y la actividad funcional de las células T reguladoras (LTreg) tanto en humanos como en animales de experimentación (Sakaguchi et al., 2008).

Recientemente, diferentes estudios apuntan un papel independiente e importante de esta nueva subpoblación de células T en la MG (Balandina et al., 2005). El número de células Treg en sangre periférica se incrementa después de las timectomías realizadas en pacientes con MG, y este incremento se correlaciona con la mejoría sintomática (Sun et al., 2004). La función de estas células es fundamentalmente anti-inflamatoria y están encargadas del mantenimiento de la homeostasis inmune controlando los fenómenos de autotolerancia (Sakaguchi et al., 2004), evitando el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Existen varios tipos de Treg: las nTreg son generadas en el timo y adquieren la expresión del factor de transcripción Foxp3; las iTreg son generadas por las células T naïve en la periferia o in vitro, después de la estimulación con antígenos y TGF- β (Chen et al., 2003).

Es decir, aunque la activación de las células T autorreactivas causan varias enfermedades autoinmunes como la MG, son controladas por mecanismos de tolerancia inmune periférica como las células Treg. En el timo, las células Treg se encuentran fundamentalmente en la médula (Matsui et al., 2010).

Algunos autores informan un número disminuido de células Treg en pacientes con MG (Balandina et al., 2005; Ströbel et al., 2004; Fattorossi et al., 2005). Sin embargo, un trabajo reciente informaba que el número de células Treg no está disminuida en el timo o en la sangre periférica de pacientes con MG (Matsui et al., 2010). Sin embargo, los timocitos CD4⁺ CD25⁺ aislados en pacientes con MG presentan una expresión disminuida de RNAm para Foxp3 y un defecto en la función de supresión (Balandina et al., 2005; Chen et al., 2003; Wing and Sakaguchi, 2010).

En niños con MG, informes recientes señalan que las células T reg (CD4⁺ CD25⁺) en la sangre periférica están incrementadas aunque sus funciones no están incrementadas, indicando que la patogénesis en niños podría estar relacionada con una disminución de la inmunotolerancia mediada por las células Treg en sangre periférica (He et al., 2008).

El equilibrio entre las células Th17 y Treg comienza a entenderse con estudios recientes. TGF-beta es requerido para la diferenciación tanto de Th17 y Treg, y puede inducir la expresión para Foxp3 (clave en las Treg) y ROR γ t (clave en las Th17) (Zhou et al., 2008). Sin embargo, el tratamiento con TGF- β conduce exclusivamente al desarrollo de Treg ya que Foxp3 es capaz de unirse a ROR γ t e inhibir la activación

transcripcional de este último, ROR γ t (Zhou et al., 2008). Ahora bien, con la presencia de IL-6, esta inhibición es desactivada y por tanto la diferenciación de las células Th17 transcurre con normalidad (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Por tanto, IL-6 es capaz de actuar como potente citocina pro-inflamatoria a través de la promoción de las células Th17 e inhibición de las células Treg, indicando que IL-6 regula el equilibrio entre las células Th17 y las células Treg con un importante papel en controlar las enfermedades autoinmunes.

2.7.5. Equilibrio entre subpoblaciones de LTh

En resumen, el equilibrio entre estas cuatro poblaciones: LTh1, LTh2, LTreg, y LTh17 es determinante en el desarrollo de la MG experimental en animales (Mu et al., 2009). Para entender esto hay que ir a modelos animales de MG. En la EAMG existen dos fases de la enfermedad: la primera es mediada por macrófagos infiltrando la membrana postsináptica de la UNM. Posteriormente, se produce una fase mediada por células T auto-reactivas contra el AChR y la estimulación por medio de citocinas de células B productoras de anti-AChR. Mu et al., demostró que en la fase inicial de la enfermedad la proporción de células Th1, Th2, Th17 y Treg permanecía estable. Sin embargo, en fases tardías las poblaciones de Th1 y Th17 se incrementaban mientras las otras dos poblaciones, Th2 y Treg permanecían estables. Además, el incremento más significativo era debido a las células Th17 (Mu et al., 2009). Hay que recordar, que las poblaciones Th1 y Th17 son eminentemente pro-inflamatorias.

2.8. Citocinas

Las citocinas incluyen interleucinas, linfocinas, monocinas, interferones, factor de necrosis tumoral, factores estimulantes de colonias y factores transformadores de crecimiento. Son producidas por macrófagos, células T, células B, monocitos, neutrófilos, células dendríticas pero también plaquetas, células endoteliales, hepatocitos y células musculares lisas vasculares (Sprague and Khalil, 2009).

Las citocinas son pequeñas proteínas solubles de bajo peso molecular, con una vida media muy corta. Las citocinas circulantes actúan sobre receptores específicos de diferentes líneas celulares, activando vías de señalización que conducen a diferentes procesos inflamatorios como adhesión celular, permeabilidad y apoptosis (Sprague and Khalil, 2009).

El papel que desempeñan las diferentes citocinas puede estudiarse en la EAMG consiguiendo animales de experimentación que congénitamente expresan en exceso o son deficientes de la citocina a estudio. En estos estudios, numerosos informes señalan que las células Th1 y sus citocinas son imprescindibles para el desarrollo de la EAMG, a través de la síntesis de anti-AChR capaces de activar el complemento produciendo la lesión local en la unión neuromuscular. Esto es considerado la lesión primaria en la MG.

2.9. Citocinas estudiadas

2.9.1. TNF- α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina producida por células T, monocitos y macrófagos (Zhang, Navikas and Link, 1997). Tiene dos formas biológicas activas: la forma transmembranal y la forma soluble. La forma transmembranal se corta por TACE o ADAM17 (matrix metalloprotease TNF alpha converting enzyme)

produciendo la forma soluble de este mediador. Es considerada un citocina Th1 dependiente. Está implicada en el desarrollo de la EAMG ([Christadoss and Goluszko, 2002](#)). El bloqueo de este mediador con anticuerpos monoclonales suprime la EAMG ([Duan et al., 2002](#)).

En humanos, en una serie de 11 pacientes con MG, el tratamiento con etanercept (receptor soluble de TNF- α) producía mejoría en 6 de ellos, y empeoramiento en 2. Los niveles séricos de TNF- α ni los anti-AChR se veían modificados con el tratamiento. Sólo en un paciente se incrementaban los niveles séricos de este mediador, correlacionados con las fases de empeoramiento clínico ([Rowin et al., 2004](#); [Rowin , 2008](#)). Resultados similares han sido descritos por otros investigadores ([Tüzün, Meriggioli and Rowin, 2005](#)). Además, infliximab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra TNF- α , mejoró la función muscular y el título de anticuerpos disminuyó en un paciente con MG ([Kakoulidou et al., 2007](#)).

Recientemente, un trabajo no encontró relación entre los niveles séricos de TNF- α con la gravedad de la enfermedad ni con los niveles de anti-AChR ([Lee, Joo and Seok, 2009](#)), aunque dos tercios de los pacientes estaban en tratamiento inmunosupresor, lo que puede conducir a conclusiones erróneas. En otro estudio se encontró una correlación entre la producción de TNF- α y la condición de MG usando cultivos celulares mononucleares ([Ahlberg, Pirskanen and Lefvert, 1991](#)).

En conclusión, a pesar de que hay informes sobre el beneficio moderado de tratamientos que bloquen al TNF- α en MG y evidencias de la implicación de este mediador en EAMG, la utilidad en la medición de los niveles séricos de TNF- α en pacientes con MG no está aclarada.

2.9.2. IL-17

La IL-17 es producida por células T de memoria activadas. También es producida por células NK y neutrófilos. Es considerada un citocina pro-inflamatoria (induciendo otras citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α). Participa en la defensa contra diversos patógenos, como bacterias y hongos (Korn et al., 2007). Otra función de esta citocina consiste en el reclutamiento de monocitos y neutrófilos a través del incremento de la producción local de quimiocinas (IL-8, la proteína 1 quimiotáctica de los monocitos o MCP-1, oncogén de crecimiento regulado alfa) (Witowski J et al., 2000; Ruddy MJ et al., 2004).

IL-17 dirige la acumulación de linfocitos B en los centros germinales del timo gracias a la expresión de proteínas de señal G, Rgs13 y Rgs16. Además, la ausencia de esta citocina conduce a una reducción de la formación de centros germinales con un menor número de células B (Hsu et al., 2008). Mu et al., demostraron que las células B específicas para AChR se estimulaban como consecuencia del tratamiento con IL-17, sugiriendo que IL-17 podría agravar la enfermedad en animales de experimentación (Mu et al., 2009).

Recientemente, ha sido relacionada en la patogénesis de otras enfermedades autoinmunes experimentales o humanas como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (Tzartos et al., 2008; Wong et al., 2000; Aggarwal et al., 2002; Veldhoe et al., 2006).

Baggi et al. estudiaron el efecto de la inmunoadsorción (IA) IgG sobre las citocinas en un número muy reducido de pacientes con MG y el síndrome miasténico de Lambert-Eaton. A diferencia de la MG, en el LEMS los autoanticuerpos dirigidos a los VGCC no activan el complemento sino que la patogenia se debe al bloqueo de la transmisión al interferir con los canales de calcio (Lang et al., 2003). Encontró que los niveles basales

de IL-17 eran significativamente mayores en los 5 pacientes con MG comparadas con los pacientes con síndrome de Eaton-Lambert. Sin embargo, los niveles no se veían modificados con el tratamiento, al igual que ocurría con otras citocinas pro-inflamatorias como IL-6 o IFN- γ (Baggi F et al., 2008).

No hay estudios precedentes que estudien los niveles séricos de IL-17 en pacientes miasténicos comparados con controles sanos ni su posible relación con la gravedad de la enfermedad.

2.9.3. sCD40L

El ligando CD40L, también llamado sCD154, es una proteína transmembrana, perteneciente a la superfamilia del TNF. Se expresa en células T helper CD4⁺ activadas, plaquetas y células musculares lisas vasculares. Participa en la diferenciación y proliferación de las células B (Saeland et al., 1993) y en los intercambios de isotopos de los anticuerpos (Lederman et al., 1994).

La activación de las células T requiere dos señales. Una señal es proporcionada por la interacción TCR/MHC. La otra es proporcionada por la coestimulación CD28/B7 (Sperling and Bluestone, 1996). El marcador CD28 es expresado en todas las células T, mientras que su receptor B7-1(CD80) y B7-2(CD86) es expresado en las células presentadoras de antígenos (CPA). Además de estas dos coestimulaciones, la vía CD40/CD40L es requerida para la secreción de citocinas por parte de las células T activadas (Grewal et al., 1996). En concreto, las células Th activan a las células B en reposo a través del reconocimiento TCR de las moléculas MHC de clase II y de la interacción CD40/CD40L. El CD40L es una proteína de membrana expresada fundamentalmente en las células CD4⁺ activadas, mientras que su receptor, CD40, es

expresado en las CPA, como células B, células dendríticas y macrófagos (Grewal et al., 1996).

En la EAMG, Shi et al. informaron que ratones deficientes de CD28 (CD28^{-/-}) eran menos susceptibles a la inducción de la enfermedad, pero los ratones deficientes de CD40L (CD40L^{-/-}) eran completamente resistentes a la enfermedad (Shi et al., 1998). Esto indica que los requerimientos de estas dos interacciones son diferentes, pero mucho más importante la CD40/CD40L en la patogénesis de EAMG. Esta interacción induce la proliferación en las células B, potenciada por la IL-4 e IL-10 en humanos, y por IL-4 e IL-5 en animales.

La interacción CD40/CD40L también activa a los macrófagos para producir citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, molécula de adhesión intercelular-1) (Schönbeck, Mach and Libby, 2000), y para activar y producir la expansión clonal de células T antígeno-específicas (Stout et al., 1996). Algunos estudios, además, sugieren que CD40L es crucial para la formación del centro germinal en el timo.

Vista la importancia del marcador, fundamentalmente en la actividad de las células B, ha sido implicado en otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, donde ya ha sido demostrado que los pacientes presentan niveles elevados de CD40L en sangre periférica comparado con controles sanos (Lee et al., 2006; Vakkalanka et al., 1999), y el marcador CD40 se expresa en las células T en exceso en estos pacientes (Yazdany and Davis, 2004).

En animales, se ha demostrado que el tratamiento anti-CD40L es una manera efectiva para suprimir la EAMG cuando es dado a los animales, incluso en estadios crónicos de la enfermedad. El perfil de citocinas en estas ratas sugiere un efecto sobre las células

Th1, pero no en las Th2 o Th3 ni inducción en las células T reguladoras (Im et al., 2001). En humanos, algunos fármacos empleados en pacientes con MG, los inhibidores de la calcineurina (ej. tacrolimus o ciclosporina) disminuyen la expresión del CD40 ligando en las células T y evita que las células B en reposo sean activadas (Masuda et al., 2010). Esto abre vías inexploradas sobre la función que puede desempeñar este marcador en la MG con implicaciones terapéuticas.

2.9.4. IFN- γ

IFN- γ es la citocina más representativa de las células Th1. Es considerada un citocina pro-inflamatoria. En pacientes con esclerosis múltiple los niveles de esta citocina se correlacionan con la fase de la enfermedad, incrementándose en los brotes y disminuyendo en las fases de remisión. Apoyando a esto, existen informes demostrando un empeoramiento clínico en aquellos pacientes tratados con IFN-gamma (Merrill et al., 1992, Panitch, 1992).

En la EAMG, ratones deficitarios del receptor para IFN- γ , ratones IFN- γ R^{-/-}, la incidencia y severidad de la enfermedad está disminuida mientras que ratones deficitarios de IFN- γ , IFN- γ ^{-/-}, la inducción de la EAMG está incluso completamente bloqueada (Balasa et al., 1997; Balasa and Sarvetnick, 2000).

Esto sugiere el requerimiento de IFN- γ para la inducción de la enfermedad. Sin embargo, para nuestro conocimiento no existen datos sobre si los niveles séricos de pacientes con MG se relacionan con las diferentes formas clínicas y la gravedad de la enfermedad.

2.9.5. IL-6

La IL-6 es sintetizada fundamentalmente por linfocitos, fibroblastos y células endoteliales (Hirano, 1998). En cuanto a las poblaciones de células T y B, sólo son sintetizadas por aquellas células que se han diferenciado en Th2 y Be2, respectivamente (Mosmann et al., 1986; Harris et al., 2000).

La IL-6 es una citocina con un amplio rango de actividades biológicas implicadas en procesos de regulación inmune e inflamación (Hirano et al., 1986). IL-6 es uno de los factores estimulantes de las células B más importantes. Además, IL-6 está implicada en el reclutamiento de células inflamatorias (López-Pedrerera et al., 2010).

Otra de las funciones más importantes de IL-6 es inducir la generación de células Th17 a partir de las células T naïve, junto con TGF- β , e inhibe la diferenciación de las células T reg inducidas por TGF- β (Bettelli et al., Mangan et al., 2006; Velhoen et al., 2006). Por tanto, IL-6 es capaz de actuar como potente citocina pro-inflamatoria a través de la promoción de las células Th17 y la inhibición de las células Treg, indicando que IL-6 regula el equilibrio entre las células Th17 y las células Treg con un importante papel en controlar las enfermedades autoinmunes.

Considerando sus funciones sobre las células Th17 y Treg y su papel estimulador de células B, IL-6 ha sido sugerida como una potencial diana terapéutica para diferentes enfermedades autoinmunes. Así, ha sido efectiva en el tratamiento de algunas condiciones autoinmunes como la artritis reumatoide y la enfermedad de Castleman (Nishimoto et al., 2008; Yokota et al., 2008) y relacionada en la patogénesis de la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple o el lupus eritematoso sistémico (Youinou and Jamin, 2009).

Finalmente, informes recientes encuentran que el tratamiento con etanercept en pacientes con MG es más beneficioso en aquellos con niveles disminuidos de IL-6 e IFN- γ en plasma (Tüzün, Meriglioli and Rowin, 2005). La función y utilidad de IL-6 en MG en humanos no ha sido aclarada hasta la fecha.

2.9.6. IL-10

Conocida originariamente como factor inhibitorio de citocinas (CSIF), es una citocina producida por las células Th2. También es producida por las células B y por macrófagos.

Una de sus funciones consiste en inhibir la actividad de las citocinas dependientes de la vía Th1. También promueve la proliferación de las células B y su diferenciación en células secretoras de inmunoglobulinas (Howard and O'Garra, 1992). IL-10 junto con IL-4 (citocina Th2-dependiente) tienen efectos sinérgicos para inhibir la inmunidad mediada por las células T (Powrie, Menon and Coffman, 1993) así como a macrófagos o monocitos. También es capaz de estimular la producción del antiinflamatorio antagonista receptor de IL-1. Estos hechos indican un potente papel antiinflamatorio de IL-10.

Debido a esto, IL-10 ha demostrado *in vivo* e *in vitro* efectos beneficiosos en modelos de sepsis, endotoxemia, pancreatitis, uveítis, queratitis, hepatitis, lesiones cerebrales, pulmonares o de la médula espinal y otras condiciones autoinmunes como la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal.

Sin embargo, la IL-10 es un mediador con un comportamiento complejo, con funciones inmunoestimuladoras al mismo tiempo. Entre ellas, potencia la expresión de moléculas de MHC de clase II por células B. Además, potencia la proliferación de las células B y

su diferenciación en células secretoras de inmunoglobulinas. También es capaz de favorecer la proliferación de células T CD8+ y células mastoideas.

En humanos, en otras enfermedades autoinmunes con en el LES, los niveles de IL-10 están incrementados (Park et al., 1998). Además, ciertos alelos de IL-10 están asociados en pacientes con MG con niveles más elevados de anti-AChR en suero (Huang et al., 1999).

Desde un punto de vista terapéutico, en otras enfermedades experimentales como la encefalomielitis alérgica experimental o la neuritis autoinmune experimental autoinmune ha demostrado su eficacia (Cua et al., 1999; Bai et al., 1997). En la EAMG, el tratamiento con IL-10 a bajas dosis en ratas fracasó para controlar la EAMG, mientras que el tratamiento con IL-10 a altas dosis produjo un agravamiento de la enfermedad (Zhang et al., 2001), acompañado por un aumento de las respuestas de las células B y Th2 y un descenso de la actividad de las células Th1. Esto implica que la IL-10 en animales juega un papel inductor en la EAMG.

Informes previos señalan que los niveles de IL-10 está asociados con el título de anti-AChR y la respuesta al tratamiento en pacientes con MG juvenil (Yapici et al., 2007). Xiao et al., informa que el tratamiento (inyecciones subcutáneas) con células dendríticas tratadas con IL-10 no mejora los síntomas o parámetros inmunológicos (Xiao et al., 2006).

IL-10 es una citocina extremadamente compleja con funciones, *a priori*, opuestas.

2.10. Complemento

En pacientes con MG y en animales en la EAMG se ha demostrado la presencia en la unión neuromuscular de anti-AChR y de los componentes del complemento C3, C9 y del complejo de ataque a la membrana (CAM) (Lindstöm M et al., 1976). Como se ha descrito al inicio, la activación del complemento con la formación posterior del CAM es considerado la lesión primaria de la enfermedad.

En animales existen amplias evidencias del papel crucial que desempeña el sistema del complemento en la patogénesis de la MG, de tal forma que la depleción del complemento y el bloqueo de componentes del complemento (ej.anti-C6, anti-C5) o inhibidores del complemento (CR1 soluble) protege a los animales del desarrollo de la EAMG (Soltys et al., 2009). En humanos, estos fármacos (en concreto, anti-C5: eculizumab) han sido ya empleados en otras condiciones como en el trasplante de pulmón, el infarto agudo de miocardio o la hemoglobinuria paroxística nocturna, demostrando seguridad y tolerancia a corto plazo.

Estudios previos informan que niveles de algunos componentes del complemento se correlacionan con el estadio clínico evolutivo de la enfermedad, de tal forma que niveles séricos incrementados aparecen en pacientes en fase de exacerbación y que niveles séricos disminuidos aparecen pacientes en fase de remisión.

Por otra parte, los niveles de C5 y C9, componente clave y terminal de los complejos de ataque a la membrana no han sido estudiados en suero de pacientes con MG.

2.11. Timo

El 10% de los pacientes con MG presentan un timoma asociado. Y a la inversa, el 50% de los timomas están asociados con MG.

El timo es considerado el lugar primario para el inicio de la enfermedad autoinmune en la MG seropositiva (el papel del timo en la MG seronegativa es cuestionable) (Cavalcante et al., 2011). Esta afirmación está basada en tres conceptos:

- a) Hasta el 80% de los pacientes con MG seropositiva (con anti-AChR) presentan alteraciones histológicas en el timo (Cavalcante et al., 2011).
- b) El timo contiene todos los elementos necesarios para la producción de anti-AChR.
- c) La timectomía en muchos pacientes con MG produce remisión clínica.

Con respecto al punto a), los pacientes con MG presentan hiperplasia folicular, hiperplasia difusa o timitis, involución tímica y timoma. Los timomas en los pacientes con MG suelen ser de estirpe epitelial. Presentan un crecimiento local y lento, con una tendencia a la recidiva muy poco frecuente. Además, el epitelio neoplásico en las células de timomas expresan antígenos AChR-like, titina-like o ryanodina-like.

La hiperplasia tímica es más frecuente en la MG de debut precoz, y la involución tímica en la MG de debut tardío. El timoma presenta un pico de edad a los 50 años y es rara en pacientes con debut de síntomas por encima de los 60 años. La presencia en el espacio perivascular de centros germinales indica la activación y proliferación de los LB. Los pacientes con hiperplasia folicular tienen un título en suero mayor de anti-AChR (Lindstrom et al., 1976). En los centros germinales, los LB están en cercanía y son estimulados por mediadores solubles por las células dendríticas. Estas células

dendríticas y otras células como macrófagos y monocitos producen el factor de activación de linfocitos B (BAFF) (Moore et al., 1999; Schneider et al., 1999; Nardelli et al., 2001), cuyo papel en la MG está cobrando mayor interés.

Curiosamente, los pacientes con anti-MuSK no presentan alteraciones significativas en el timo comparados con controles de edades similares. Los pacientes seronegativos pueden presentar alteraciones hiperplásicas en proporciones variables (Cavalcante et al., 2011; Wekerle et al., 1978; Vincent, Palace and Hilton-Jones, 2001).

Una de las características más interesantes de los pacientes con MG asociado a timoma es que la gran mayoría de ellos, a excepción de 3 casos descritos en la literatura, es la asociación constante con autoanticuerpos anti-AChR en suero (Rigamonti et al., 2011; Maggi et al., 2008). Estos tres casos seronegativos eran pacientes con debilidad generalizada y afectación bulbar. Todos ellos consiguieron la remisión de la enfermedad controlada farmacológicamente.

Con respecto al punto b), desde hace más de 30 años se sabe que timocitos cultivados *in vitro* son capaces de producir anticuerpos anti-AChR (Vincent et al., 1978). El timo es el lugar primario para el desarrollo de las células T y está encargado de la eliminación de las células autorreactivas (Vincent, Palace and Hilton-Jones, 2001).

El AChR está expresado en las células mioideas que se encuentran inmersas en el epitelio medular del timo, tanto en pacientes con MG como en controles sanos (Schluep et al., 1987). Estas células musculares también expresan otros antígenos como actina, miosina, troponina T, creatin kinasa, miogenina o desmina. Es interesante saber que estas células mioideas humanas inoculadas en ratones son capaces de diferenciarse en células musculares (Spuler et al., 1996). Es decir, podemos considerar a estas células

mioides como células musculares en el timo. Además, estas células mioides tímicas son las únicas células del organismo que expresan el AChR fuera del músculo estriado.

Estas células mioides no expresan en su superficie moléculas MHC de clase II, por lo que no pueden presentar el antígeno (en este caso el AChR) a las células T CD4⁺. Esta función la realizan diferentes células presentadoras de antígenos presentes en el timo como las células dendríticas. Por último, las células mioides tímicas expresan la misma cantidad de AChR ya sean células de timos de pacientes con MG comparado con timos de controles; pero en cambio los pacientes con hiperplasia tímica presentan mayor número de células mioides comparados con timos atróficos involucionados (Kirchner et al., 1986).

Finalmente, con respecto al punto c), como mencionamos en el capítulo 1 la timectomía en muchos pacientes produce mejoría de los síntomas miasténicos. No hay dudas de que la timectomía deba realizarse en todos los pacientes con timoma. En algunos casos asociando quimioterapia y/o radioterapia. Con respecto a los pacientes con MG pero sin timoma, las indicaciones no están del todo claras. En general, hay consenso que puede considerarse en pacientes con MG y debut tardío, con anti-AChR y síntomas generalizados (ver apartado *1.6.4. Timectomía*). De realizarse la intervención, hay que practicarla en los tres primeros años de evolución para obtener una buena respuesta clínica.

2.12. Inmunogenética

Existen evidencias de una predisposición genética para la MG. Pacientes con debut precoz y tardío tienen diferentes asociaciones con el sistema HLA (Maggi et al., 1991). Así, el 60% de los pacientes miasténicos con debut precoz son HLA-B8 y HLA-DR3 positivos. Además estos haplotipos también se asocian con la presencia de hiperplasia

tímica. En cambio, la MG con debut tardío se asocia, aunque débilmente, con el HLA-DR2 y B7. En esta línea, los haplotipos del sistema HLA pueden presentar además asociación negativa con subtipos de MG: DR3 con MG de debut tardío y DR7 con MG de debut precoz.

La MG ocular está asociada con el HLA-BW46 (Uono, 1980). En países asiáticos como China o Japón los pacientes presentan alta frecuencia del HLA-DR9. Además, pacientes con debut precoz tienen más riesgo de presentar otras enfermedades autoinmunes y los hermanos gemelos monozigotos presentan un incremento de riesgo para desarrollar la enfermedad (Oosterhuis, 1989). Los pacientes con anti-MuSK presentan una asociación con el HLA DR14-DQ5

Otros genes diferentes del sistema HLA también se han asociado con la MG, como PTPN22, FCGR2 y CHRNA1. Interesantemente, el gen CHRNA1 codifica la subunidad alfa del AChR (Giraud, Vandiedonck, Garchon, 2008).

Estos hallazgos apoyan la base genética en la inducción y desarrollo de la MG en humanos. El grado de influencia de la carga genética deberá ser aclarado en el futuro.

Inmunopatogenia en Miastenia Gravis

3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Justificación

Como hemos visto en los capítulos previos, la gran mayoría de pacientes (hasta un 85%) presentan la forma generalizada de la enfermedad a lo largo de la evolución, requiriendo tratamientos inmunosupresores para el control de los síntomas.

Los inmunomoduladores son potentes agentes farmacológicos capaces de inhibir el sistema inmune humano disminuyendo o remitiendo la enfermedad autoinmune pero con reacciones adversas indirectas no deseables y potenciales serias complicaciones. Esto se debe a que la mayoría de estos fármacos son poco selectivos a la hora de bloquear las diferentes vías inmunitarias.

Por todo esto, es de vital importancia focalizar los estudios en el conocimiento exhaustivo de los mecanismos, células, y vías de señal implicadas en la patogenia de la MG autoinmune (y en cada uno de los subgrupos de la enfermedad) con el fin de controlar el desorden inmunológico de una forma mucho más selectiva que hasta la fecha.

El presente trabajo tiene como principal objetivo discernir cuál o cuáles de entre las diferentes vías inmunológicas en el ser humano tiene una mayor relevancia en la patogénesis de la MG autoinmune y en sus diferentes subgrupos.

El sistema inmune es una red compleja con múltiples elementos e interacciones no triviales gobernadas por dinámicas no lineales.

3.2. Hipótesis

3.2.1. Hipótesis inmunológicas

Dado que la subpoblación LTh17 es la población de células T helper CD4⁺ con mayor relevancia entre los distintos subgrupos de LT helper en la patogénesis de MG, su citocina más representativa, IL-17, debe estar incrementada en pacientes con MG.

Puesto que en la EAMG el tratamiento con IL-17 agrava la enfermedad, los niveles de esta citocina deben relacionarse con la gravedad de la enfermedad en humanos.

IFN- γ es una citocina LTh1 dependiente. Dado que es una citocina pro-inflamatoria y con la población LTh1 incrementada en la EAMG, los pacientes con MG deben presentar niveles incrementados de IFN- γ y además deben estar correlacionados con la gravedad de la enfermedad.

IL-10, citocina LTh2, presenta un comportamiento complejo y pleiotrópico: anti-inflamatorio inhibiendo las citocinas Th1 dependientes, y por otro lado, pro-inflamatorio, induciendo la proliferación y diferenciación de células B. Esto presupone que sus niveles en pacientes con MG no deben diferir al de los controles.

IL-6. Considerando su papel estimulador sobre las células Th17, su función inhibitoria de las células Treg, además de ser considerada uno de los principales estimuladores de las células B, esperamos encontrar niveles incrementados de esta citocina en suero de pacientes con MG y correlacionados con la gravedad de la enfermedad.

TNF- α . Considerando que es una citocina LTh1 dependiente, su implicación en el desarrollo de EAMG y el beneficio clínico que producen los fármacos que inhiben su función (infliximab, etanercept), esperamos encontrar niveles de TNF- α incrementados en el suero de los pacientes con MG.

sCD40L. Considerando que i) CD40L participa en la proliferación y diferenciación de las células B, y que ii) los niveles de este mediador han sido encontrados elevados en otras enfermedades autoinmunes, esperamos encontrar niveles séricos incrementados en pacientes con MG.

La activación del complemento conlleva incrementos de la síntesis de los componentes del complemento traducido por un incremento sérico de estas proteínas.

3.3. Objetivos

3.3.2. Objetivos clínico-epidemiológicos

Conocer la incidencia de MG autoinmune en nuestro medio

Conocer las características clínicas de presentación en nuestro medio de pacientes con MG.

Conocer las características epidemiológicas en pacientes con MG *de novo* en nuestro medio.

Conocer comorbilidades, incluidas condiciones autoinmunes, asociadas a pacientes con MG de reciente diagnóstico

3.3.1. Objetivos inmunológicos

Evaluar los niveles séricos de citocinas dependientes de la vía Th1 (IFN- γ , TNF- α) en pacientes con reciente diagnóstico

Evaluar los niveles séricos de citocinas dependientes de la vía Th2 (IL-10, IL-6) en pacientes con MG de reciente diagnóstico

Evaluar los niveles séricos de IL-17, citocina Th17 dependiente, en pacientes con MG de reciente diagnóstico

Evaluar los niveles séricos de sCD40 L en pacientes con MG de reciente diagnóstico

Evaluar los niveles séricos de componentes de complemento, C3, C4, C5 y C9, en pacientes con MG de reciente diagnóstico y establecer posibles relaciones con el título de anticuerpos y con la gravedad de la enfermedad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo está organizado en dos partes. La primera parte (Sección I: epidemiológica) dirigida a aspectos epidemiológicos y clínicos; y la segunda (Sección II: epidemiológica) focalizada en aspectos inmunológicos de la enfermedad,

4.1. Tipo de estudio

Sección I (Epidemiológica): Estudio descriptivo longitudinal y prospectivo poblacional.

Sección II (Inmunológica): Estudio de casos y controles.

4.2. Población de estudio

Se reclutaron todos los casos incidentes de Miastenia Gravis autoinmune en la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) de Zaragoza.

La Unidad de Enfermedades Neuromusculares del HUMS es referencia de esta enfermedad en el Sector II del SALUD (Servicio Aragonés de Salud) englobando una población de 400.245 habitantes.

Al inicio del proyecto de investigación, los neurólogos que trabajan en los centros de especialidades pertenecientes al Sector II (C.M.E. Ramón y Cajal, C.M.E. Pablo Remacha) fueron informados sobre los objetivos del estudio y solicitándoles la notificación de los diagnósticos *de novo* de pacientes con MG.

4.3. Tiempo de estudio

Periodo de 24 meses: desde el 1 de Abril de 2009 al 1 de Abril de 2011.

4.4. Población diana

Pacientes con MG autoinmune con diagnóstico *de novo*.

4.5. Criterios de inclusión

Sección I (Epidemiológica):

- Pacientes con diagnóstico *de novo* de MG autoinmune.
- Consentimiento informado aceptado por el paciente.

Sección II (Inmunológica):

- Pacientes con diagnóstico *de novo* de MG autoinmune.
- Consentimiento informado aceptado por el paciente.

4.6. Criterios de exclusión

Sección I (Epidemiológica):

- No aceptación del consentimiento informado.

Sección II (Inmunológica):

- Paciente que hayan recibido tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor (ej: corticoesteroides, inmunoglobulinas IV, plasmaféresis, azatioprina,

ciclosporina A, micofenolato mofetil, metotrexate, ciclofosfamida, rituximab) en los últimos 6 meses.

- Pacientes con MG que no acepten el consentimiento informado.

4.7. Variables de estudio

Se recogieron los siguientes datos:

4.7.1. Clínicas

- Fecha de nacimiento.
- Edad de inicio de síntomas.
 - Inicio precoz: pacientes con inicio de la enfermedad antes de los 50 años.
 - Inicio tardío: pacientes con inicio de la enfermedad después de los 50 años.
- Sexo:
 - Hombre.
 - Mujer.
- Criterio diagnóstico empleado: El diagnóstico estaba basado en una presentación clínica típica (ptosis, diplopía, debilidad en brazos, piernas y bulbar, fracaso respiratorio) y al menos uno de los siguientes test positivos:

- Electrofisiológico: un decremento significativo en la estimulación repetitiva a baja frecuencia (2-5 Hz). Se consideró patológico un decremento mayor al 10% en la amplitud del potencial muscular de acción compuesto. Los músculos estudiados habitualmente eran proximales (deltoides, trapecio y bíceps) y el músculo orbicularis oculis.
 - Serológico: un incremento sérico de anticuerpos anti-AChR (valor patológico > 0.2 nmol/L) por un método de inmunoprecipitación. Todos los pacientes con negatividad para anti-AChR fueron sometidos al análisis de la positividad para anti-MuSK (valor patológico > 0.05 nmol/L).
 - Farmacológico: una respuesta inequívoca a drogas anticolinesterásicas (test Anticude®). Realizada preferentemente doble ciego y evaluada por un neurólogo.
- Causas de no cumplimiento de los criterios de inclusión.
 - Gravedad de la enfermedad: basada en la escala de la Asociación Americana de Miastenia Gravis (MGFA; del inglés *Myasthenia Gravis Foundation of America*) ([Jaretzi et al., 2000](#)):
 - Clase I: MG con debilidad muscular puramente ocular.
 - Clase II: MG con leve debilidad generalizada.

- ❖ A: Predominantemente afectando a músculos axiales y de extremidades.
- ❖ B: Predominantemente afectando a musculatura respiratoria, orofaríngea, o ambas.
- Clase III: MG con debilidad moderada.
 - ❖ A: Predominantemente afectando a músculos axiales y de extremidades.
 - ❖ B: Predominantemente afectando a musculatura respiratoria, orofaríngea, o ambas.
- Clase IV: MG con debilidad grave.
 - ❖ A: Predominantemente afectando a músculos axiales y de extremidades.
 - ❖ B: Predominantemente afectando a musculatura respiratoria, orofaríngea, o ambas.
- Clase V: Intubación con o sin ventilación mecánica excepto cuando es empleada rutinariamente para tratamientos postquirúrgicos.
- Enfermedades autoinmunes asociadas:
 - Enfermedad autoinmune tiroidea (ver más abajo).
 - Pénfigo vulgar: vesículas, ampollas y erosiones en la piel producida por autoanticuerpos IgG circulantes.

- Alopecia areata: enfermedad autoinmune que afecta a los folículos pilosos pudiendo afectar al vello el cuerpo y la cara.
 - Diabetes Mellitus tipo 1: también conocida como juvenil, es una enfermedad metabólica en la que se destruyen las células β del páncreas produciendo un déficit de insulina.
 - Anemia perniciosa: enfermedad que produce déficit de vitamina B12 como consecuencia de la presencia de autoanticuerpos dirigidos frente a las células parietales del fundus gástrico.
 - Otras.
-
- Alteración tímica asociada: evaluado mediante TAC torácico. Los radiólogos pertenecían al Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Universitario Miguel Servet. Evaluaron la presencia, tamaño, contorno, márgenes y forma de los lobules derecho e izquierdo del tejido tímico ([Baron et al., 1982](#)).
 - Timoma. Los timomas están estrechamente relacionados con el pericardio superior que es anterior a la aorta, arteria pulmonar o vena cava superior, aunque hay que considerar su presencia entre cualquier lugar entre el cuello inferior y el borde cardiofrénico. Son tumores bien definidos, lobulados o redondeados, homogéneos que captan contraste. Sin embargo, en ocasiones pueden aparecer regiones hemorrágicas, necróticas o quísticas. Los timomas pueden ser parcialmente o completamente rodeados por grasa y pueden contener calcificaciones
 - Hiperplasia tímica. Crecimiento glandular simétrico y difuso.
-
- Enfermedad tiroidea autoinmune asociada:

- Enfermedad de Graves: hiperplasia difusa de la glándula tiroides que conduce a la presencia de bocio e hipertiroidismo.
- Tiroiditis crónica de Hashimoto: trastorno de la glándula tiroiditis asociado a hipotiroidismo.
- Hipotiroidismo e hipertiroidismo:
 - TSH (normal: 0.34-5.60 μ UI/mL).
 - T4 libre ó tiroxina (normal: 0.58-1.64 ng/dL).
- Alteración de anticuerpos tiroideos: los antígenos se encuentran en la célula epitelial del folículo tiroideo.
 - Antireceptor de TSH: Confirma la enfermedad de Graves en pacientes con hipertiroidismo.
 - Antiperoxidasa: Sugieren origen autoinmune de la disunción tiroidea, fundamentalmente tiroiditis de Hashimoto.
 - Antitiroglobulina: Menor utilidad clínica en la valoración de enfermedad autoinmune tiroidea dado que suelen ser positivos cuando los antiperoxidasa lo son también.
- Presencia de autoanticuerpos contra antígenos de la unión neuromuscular:
 - Seropositivos para anti-AChR (patológico > 0.20 nmol/L)
 - Seropositivos para anti-MuSK (patológico > 0.05 nmol/L)
 - Seronegativos
- Presencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares:
 - Antinucleares
 - Antimitocondriales

- Ant-nDNA
 - Antimúsculo-liso
 - Anti células parietales
 - Anti-Ro
 - Anti-La
-
- Neoplasias asociadas:
 - Linfomas
 - Otras

4.7.2. Inmunológicas

- Niveles séricos de IL-10 (pg/ml)
- Niveles séricos de IL-6 (pg/ml)
- Niveles séricos de IFN- γ (pg/ml)
- Niveles séricos de TNF- α (pg/ml)
- Niveles séricos de sCD40L (pg/ml)
- Niveles séricos de IL-17 (pg/ml)
- Niveles séricos de C3 (pg/ml)
- Niveles séricos de C4 (pg/ml)
- Niveles séricos de C5 (pg/ml)
- Niveles séricos de C9 (pg/ml)

4.8. Controles

El grupo control consistió de 15 sujetos sanos sin enfermedades inflamatorias, de edades y sexo similares a los pacientes.

Los participantes fueron reclutados del personal médico, de enfermería y auxiliares de enfermería del Departamento de Neurología, cónyuges de pacientes con MG y familiares de los investigadores del proyecto.

El tiempo de extracción de las muestras de los sujetos control fue realizado a primera hora de la mañana, preferiblemente en ayunas.

El consentimiento informado fue obtenido de todos los participantes.

4.9. Procesamiento de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción e inmediatamente centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm. El tiempo de extracción de las muestras, tanto de controles como casos, fue realizado entre las 8 y 11 horas de la mañana, preferiblemente en ayunas.

Las muestras fueron conservadas a -80°C . No se realizó ningún ciclo de descongelación de las muestras. Todas las muestras fueron medidas en duplicado y analizadas simultáneamente. Fueron analizadas al final del reclutamiento y de forma ciega para los datos clínicos.

El análisis de las muestras fue realizado en el Departamento de Inmunología del Hospital Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. El análisis del complemento fue realizado por técnicas de inmunoprecipitado y la detección de citocinas mediante tecnología Luminex® xMAP® con los reactivos Milliplex de Millipore para citocinas de alta sensibilidad (ver apartado 4.10. *Tecnología Multiplex*). El rango de detección para las citocinas estudiadas oscilaba entre 3.2 pg/mL y 10,000 pg/mL.

Todas las muestras fueron recogidas en el momento de la manifestación de la enfermedad y ninguno de los participantes había tomado corticosteroides o cualquier otro inmunosupresor en los 3 meses previos.

La concentración de anti-AChR fue realizada por un laboratorio comercial en diferentes tiempos, por razones diagnósticas y terapéuticas. El método empleado fue por radioinmunoanálisis.

4.10. Tecnología Multiplex

La tecnología Luminex® xMAP® permite analizar diferentes citocinas y mediadores inmunológicos con una pequeña cantidad de suero (50 µL) de manera simultánea.

La tecnología Multiplex es un citómetro de flujo especial que trabaja con diferentes colores. La tecnología consiste de micropartículas o microesferas de látex teñidas con fluoróforos de dos colorantes en diferentes proporciones generando diversos juegos de microesferas. Se pueden distinguir hasta 100 combinaciones.

Cada juego de gotas se cubre con la captura de anticuerpos específicos para un analito. El analito capturado, procedente de la muestra a estudio, se detecta mediante un anticuerpo de detección biotinilado y estreptavidina-ficoeritrina (S-PE).

Al incidir un rayo láser se excitan los colorantes internos de cada microesfera. Un segundo láser excita el PE, el colorante fluorescente. Finalmente, procesadores digitales de alta velocidad identifican cada microesfera individual y cuantifica el resultado de este inmunoensayo basado en las señales fluorescentes.

El sistema requiere realizar una curva de calibración con cantidades de citocina conocidas (Blanco et al., 2007). El empleo de microesferas permite una superficie de

contacto antígeno-anticuerpo superior al ELISA convencional conduciendo una mayor sensibilidad en la detección de los analitos estudiados.

4.11. Análisis estadístico

4.11.1. Estadística descriptiva

En el análisis descriptivo del proyecto, el uso de histogramas fue requerido para la representación gráfica de algunos resultados.

Para contrastar la normalidad de los datos fueron empleados los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

4.11.2. Estadística analítica

4.11.2.1. Análisis univariante

En el análisis univariante, los datos son expresados, preferiblemente, con la media \pm desviación estándar (DS, del inglés *deviation standard*), cuando el conjunto de los mismos seguían un comportamiento gaussiano. En los datos con distribución no paramétrica los datos eran expresados con la mediana y el rango.

4.11.2.2. Análisis bivariante

En el análisis bivariante diferentes test fueron empleados:

En las variables cuantitativas con comportamiento no normal, el test de Mann-Whitney fue empleado para analizar las diferencias de las variables entre dos grupos. El test de Kruskal-Wallis fue empleado para la comparación de los niveles séricos entre 3 grupos.

El test t-student fue empleado para comparar variables con comportamiento normal entre dos grupos. El test ANOVA fue requerido cuando se analizaban 3 o más grupos.

Finalmente, variables cualitativas fueron comparadas con el test de Chi-cuadrado y cuando era requerido por limitaciones del anterior, el test de Fisher.

Correlaciones entre las variables cuantitativas fueron analizadas por el coeficiente de correlación empleando el método de Pearson para variables paramétricas y el método de Spearman para las variables no paramétricas.

Las diferencias eran consideradas significativas con $P < 0.05$. Todos los contrastes fueron bilaterales.

5. RESULTADOS

5.1. Sección I: epidemiología

5.1.1. Casos registrados de MG

En el tiempo de estudio de 24 meses fueron registrados 29 pacientes con diagnóstico *de novo* de MG. 3 pacientes no fueron considerados en el cálculo de incidencia, pero sí en el resto de secciones del estudio, al pertenecer a un Sector Sanitario médico diferente del estudiado (Sector Sanitario II).

5.1.1.1. Tasas de incidencia brutas

Considerando que el Sector Sanitario II de Aragón comprende una población de 400.245 habitantes, la incidencia anual es de 3,25 pacientes por 100.000 habitantes. El siguiente gráfico muestra la incidencia anual de MG específica por estrato de edad (figura 1).

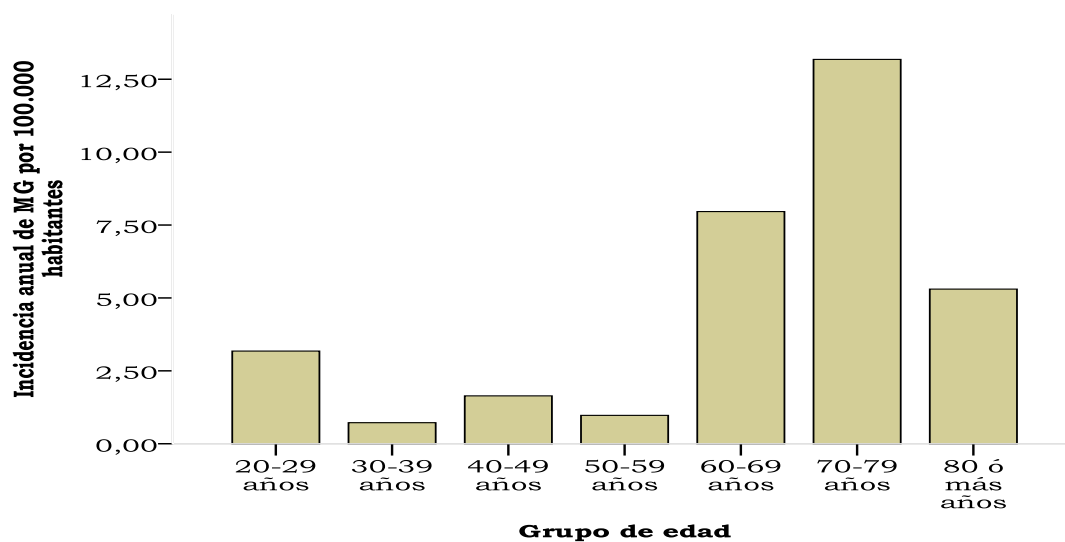


Figura 1. Incidencia anual de MG por grupo edad. Datos mostrados por cada 100.000 habitantes.

La incidencia anual específica en varones es de 3,91 nuevos casos de MG por 100.000 habitantes. La incidencia anual específica en mujeres es de 2,64 por 100.000 habitantes.

El siguiente gráfico muestra la incidencia específica anual para cada rango de edad y sexo en el Sector Sanitario II (**figura 2**).

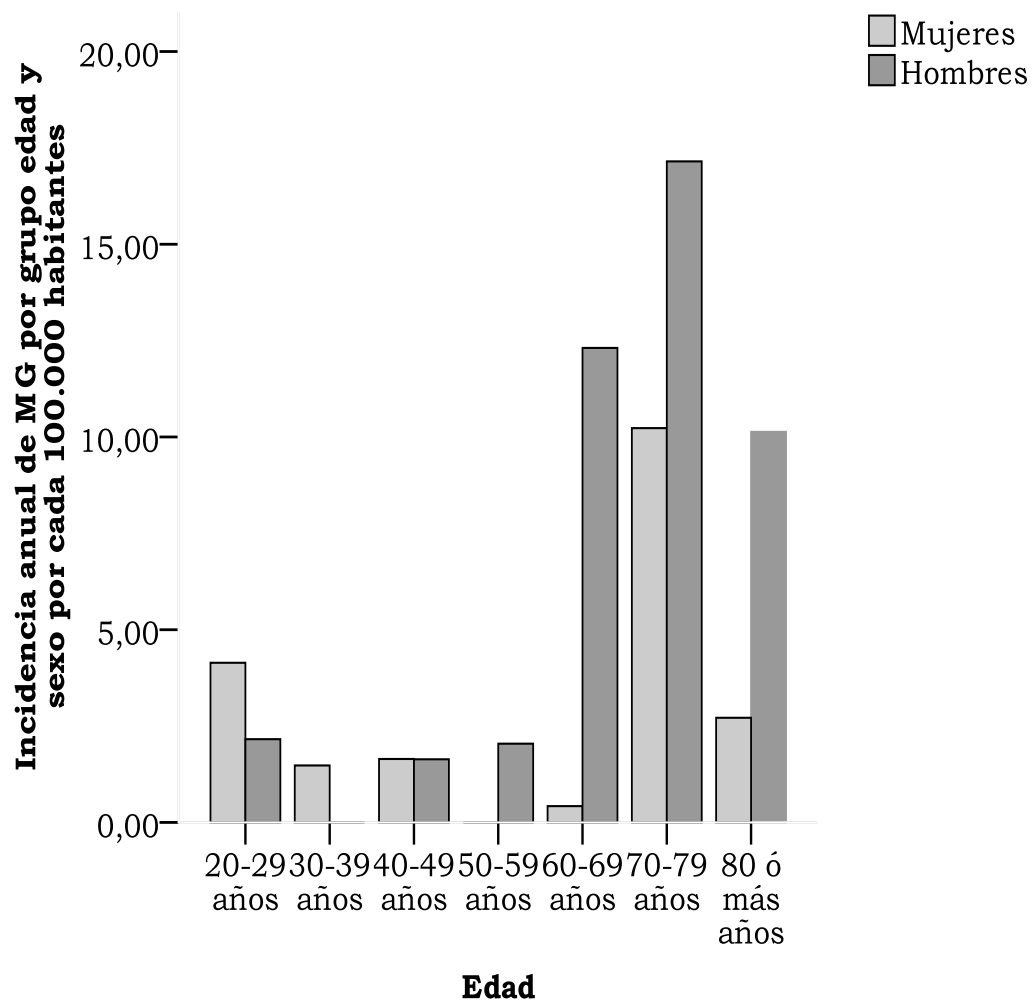


Figura 2. Incidencia anual de MG por grupo edad y sexo. Los datos de incidencia son mostrados por cada 100.000 habitantes y año.

5.1.1.2. Incidencia ajustada a la población aragonesa

Tomando como población de referencia a la población aragonesa (**Anexo I**. Fuente: Instituto Nacional de Estadística de España), la incidencia ajustada a la población aragonesa anual es de 3,17 por 100.000 habitantes.

La incidencia ajustada a la población aragonesa anual en mujeres es de 2,20 y en varones es de 3,83 por 100.000 habitantes (**tabla 1**).

5.1.1.3. Incidencia ajustada a la población española

Tomando como población de referencia a la población española con censo de 2001 (**Anexo II**. Fuente: Instituto Nacional de Estadística), la incidencia ajustada a la población española anual es de 3,01 por 100.000 habitantes.

La incidencia ajustada a la población española anual en mujeres es de 2,20 y en varones es de 3,47 por 100.000 habitantes (**tabla 1**).

5.1.1.4. Incidencia ajustada europea

Tomando como población de referencia a la población europea con fecha de 2009 (**Anexo III**. Fuente: DG Research and innovation. Datos: Eurostat), la incidencia ajustada a la población europea anual es de 3,00 por 100.000 habitantes.

La incidencia ajustada a la población europea anual en mujeres es de 2,06 y en varones es de 3,58 por 100.000 habitantes (**tabla 1**).

5.1.1.5. Incidencia ajustada a la población mundial

Tomando como población de referencia a la población mundial a fecha de 2011 (**Anexo IV**. Fuente: U.S. Census Bureau), la incidencia ajustada a la población mundial anual es de 2,09 por 100.000 habitantes.

La incidencia ajustada a la población mundial anual en mujeres es de 1,52 y en varones es de 2,31 por 100.000 habitantes (**tabla 1**).

5.1.1.6. Comparativa de incidencias

A continuación se muestran las incidencias de MG anuales brutas en nuestro medio y ajustadas a las poblaciones de referencia o estandarizadas mencionadas en los apartados anteriores (**tabla 1**).

Población	Hombres	Mujeres	Total
Sector II	3,91	2,64	3,25
Aragón	3,83	2,20	3,17
España	3,47	2,20	3,01
Europa (UE-27)	3,58	2,06	3,00
Mundial	2,09	1,52	2,31

Tabla 1. Incidencias brutas y ajustadas a diferentes poblaciones de referencia.

5.1.1.7. Incidencia temporal

La incidencia en el primer año de estudio fue de 2,75 por 100.000 habitantes y año, con 11 pacientes registrados. En el segundo año de estudio la incidencia fue de 3,75 por 100.000 habitantes y año, con 15 pacientes registrados. Las tasas son referidas a la población del Sector Sanitario II.

La incidencia en mujeres en el primer año fue de 2,40 por 100.000 habitantes y año, con 5 pacientes registrados. En el segundo año de estudio la incidencia en mujeres fue de 2,87 por 100.000 habitantes y año, con 6 pacientes registrados. Las tasas son referidas a la población del Sector Sanitario II.

La incidencia en varones en el primer año fue de 3,13 por 100.000 habitantes y año, con 6 pacientes registrados. En el segundo año de estudio la incidencia en varones fue de 4,70 por 100.000 habitantes y año, con 9 pacientes registrados. Las tasas son referidas a la población del Sector Sanitario II. La **tabla 2** muestra los datos mencionados en los párrafos anteriores.

	Primer año	Segundo año	Tiempo completo
Mujeres	2,40	2,87	2,64
Hombres	3,13	4,70	3,91
Total	2,75	3,75	3,25

Tabla 2. Tendencia en las tasas de incidencia en mujeres, varones y total.

5.1.1.8. Incidencia y edad de debut

La incidencia anual de MG de inicio precoz, antes de los 50 años, era de 1,24 pacientes por cada 100.000 habitantes. La incidencia anual de MG de inicio precoz en mujeres es de 1,66 por 100.000 habitantes. La incidencia anual de MG de inicio precoz en varones es de 0,82 por cada 100.000 habitantes.

La incidencia anual de MG de inicio tardío, en mayores de 50 años, es de 6,34 pacientes por 100.000 habitantes. La incidencia anual de MG de inicio tardío en mujeres es de 3,95 por 100.000 habitantes. La incidencia anual de MG de inicio tardío en varones es de 9,39 por cada 100.000 habitantes.

Los datos son mostrados en la siguiente tabla (**tabla 3**).

	Hombres	Mujeres	Total
MG inicio precoz	0,82	1,66	1,24
MG inicio tardío	9,39	3,95	6,34

Tabla 3. Incidencia de MG en hombres, mujeres y total de acuerdo con la edad de aparición: MG de inicio precoz (antes de los 50 años), MG de inicio tardío (después de los 50 años). Los datos de incidencia son mostrados por 100.000 habitantes y año.

5.1.1.9. Incidencia y senectud

La incidencia anual en pacientes mayores (debut después de los 70 años) con MG es de 8,81 pacientes por cada 100.000 habitantes. La incidencia anual en mujeres de MG de inicio en la senectud es de 5,27 por cada 100.000 habitantes. La incidencia anual en hombres de MG de inicio en la senectud es de 14,31 por cada 100.000 habitantes y año.

Los datos son mostrados en la siguiente tabla (**tabla 4**).

	Hombres	Mujeres	Total
MG de inicio en la senectud	14,31	5,27	8,81

Tabla 4. Incidencia de MG en hombres, mujeres y total después de los 70 años (MG de inicio en la senectud). Las tasas de incidencia son mostradas por 100.000 habitantes y año.

5.1.2. Edad de presentación

6 (21%) de los 29 pacientes (fíjese que se incluyen todos los pacientes registrados independientemente del Sector Sanitario al que pertenecen) presentaron un debut precoz (antes de los 50 años). En cambio, 23 (79%) de los 29 pacientes presentaron un debut tardío (después de los 50 años).

El siguiente gráfico (**figura 3**) muestra un comportamiento bimodal en cuanto a la edad de aparición. El primer pico de edad aparece entre los 20 y 40 años, y el segundo pico de edad aparece entre los 60 y 80 años. Este segundo pico es de mayor altura, traduciendo una mayor incidencia.

La edad media de presentación en la cohorte entera es de $64,0 \pm 17,6$ años (mediana 68 años; rango 21-87 años).

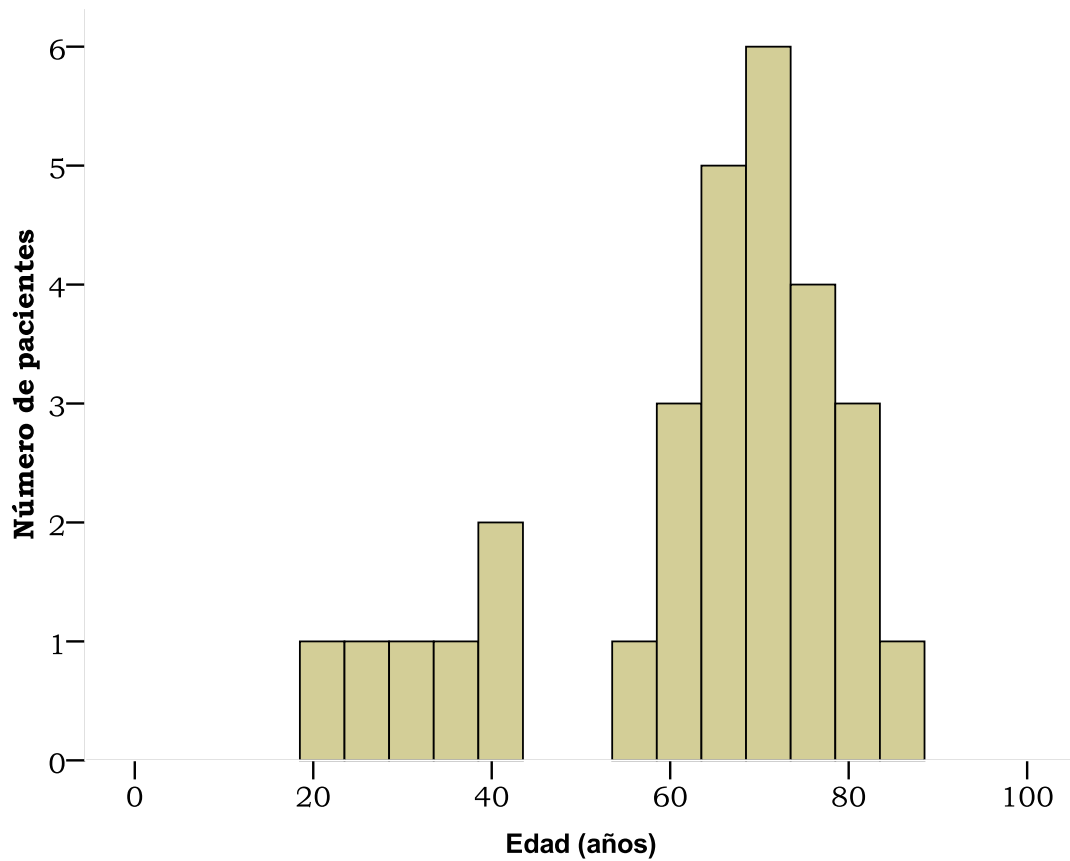


Figura 3. Número de pacientes con MG *de novo* de acuerdo a la edad de presentación de la enfermedad.

La variable *edad* presentaba una distribución normal ($P=0,078$ Kolgomorov-Smirnov), como se muestra un gráfico Q-Q de la variable *edad* en la siguiente figura (**figura 4**).

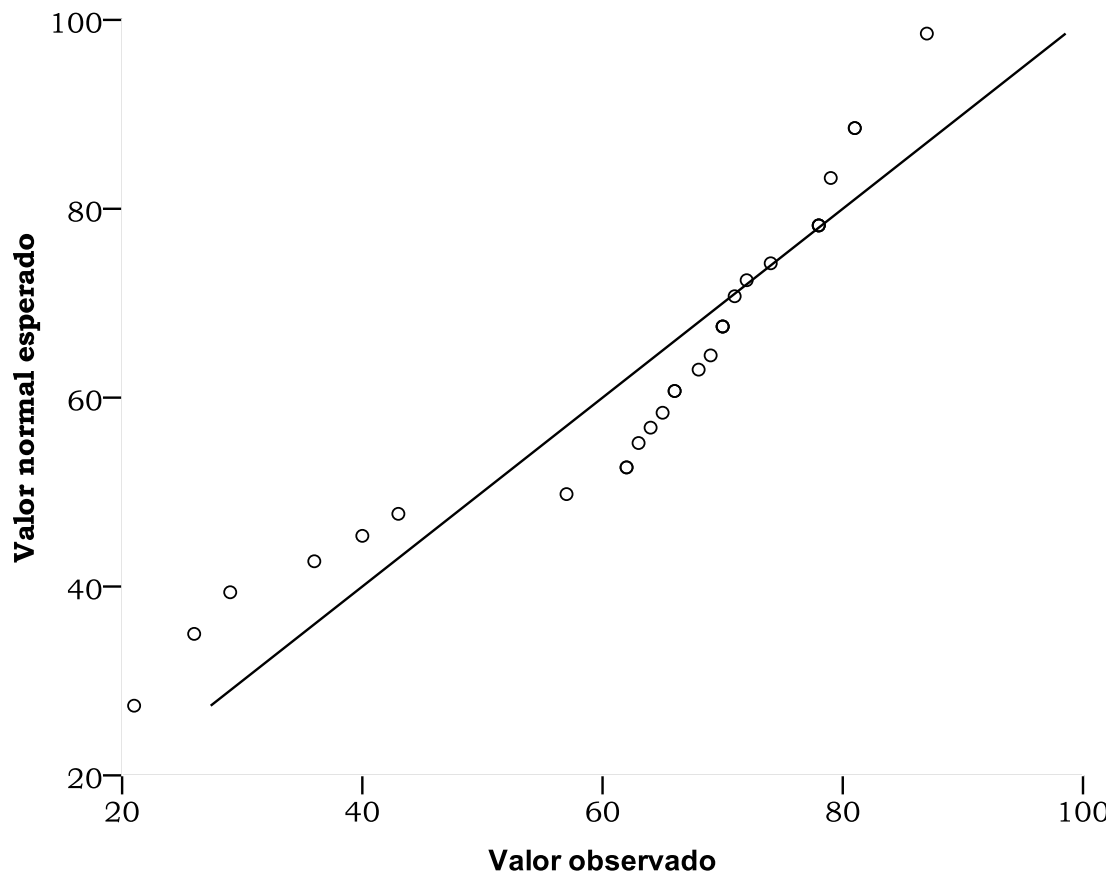


Figura 4. Gráfico Q-Q de la edad de aparición de síntomas en la cohorte de pacientes (n=29).

Al clasificar a los pacientes de acuerdo con el sexo, la edad media de presentación en los varones era de $66,1 \pm 14,4$ años (mediana 67 años; rango 29-87 años) (**figura x**).

En las mujeres la edad media de presentación era de $59,1 \pm 20,8$ años (mediana 69 años; rango 21-81 años) (**figura 5**).

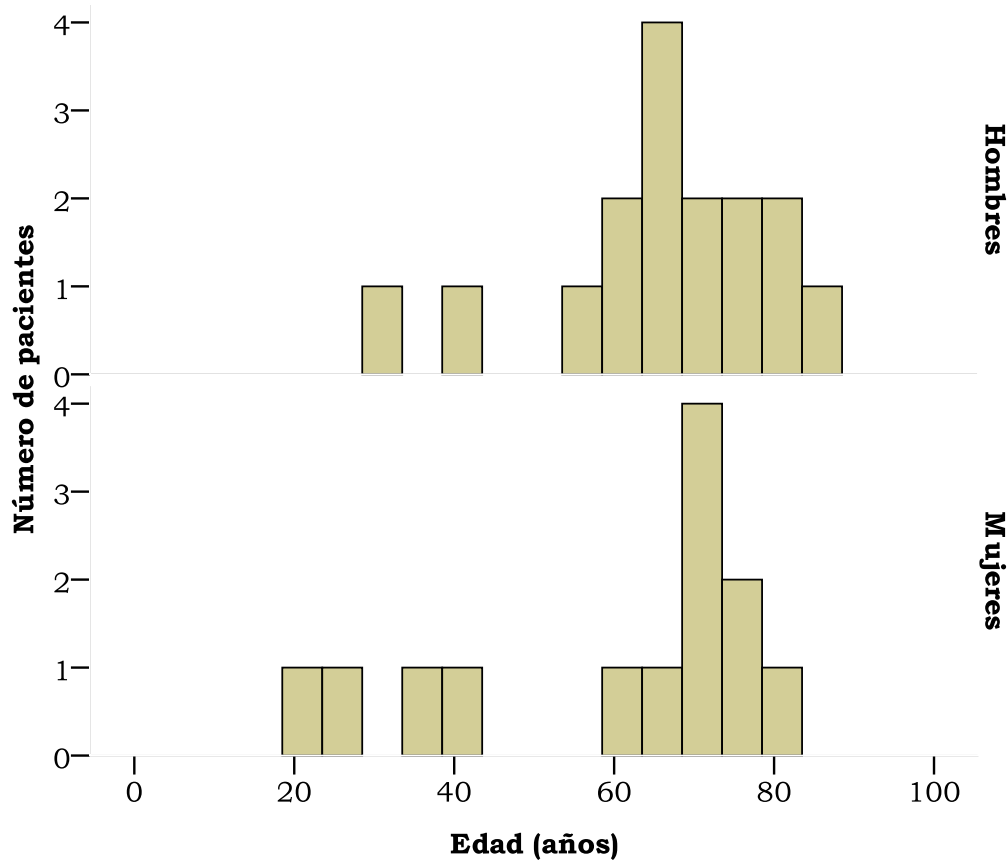


Figura 5. Edad de debut de la enfermedad de acuerdo con el sexo en la cohorte de pacientes.

5.1.2.1. Edad de presentación y forma clínica

Los pacientes con MG ocular tenían una edad media de presentación de $62,2 \pm 18,1$ años (mediana 66 años, rango 21-87 años). Los pacientes con MG generalizada tenían una edad media de presentación de $64,5 \pm 17,3$ años (mediana 70 años, rango 26-81 años).

La distribución de los años de acuerdo con la forma clínica de presentación presentaba un comportamiento no normal (MG ocular: 0,008 Kolmogorov-Smirnov; 0,030 Shapiro-Wilk; MG generalizada: 0,044 Kolmogorov-Smirnov; 0,031 Shapiro-Wilk; MG generalizada).

No existían diferencias significativas entre la edad media de presentación entre la MG ocular y MG generalizada ($P=0,630$). Los datos son mostrados en el siguiente diagrama (figura 6).

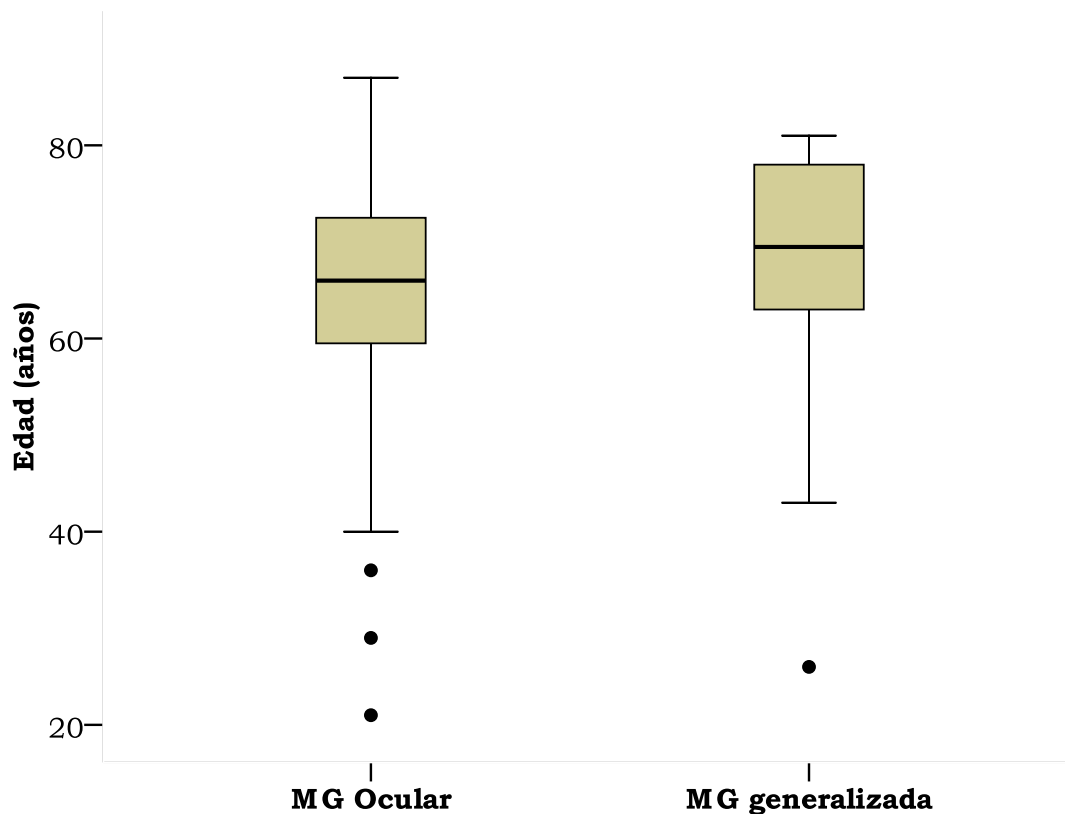


Figura 6. Edad media de presentación de los pacientes de acuerdo con la forma clínica de presentación.

5.1.3. Sexo

De los 29 pacientes con MG *de novo*, 16 pacientes (55%) eran varones y 13 pacientes (45%) eran mujeres.

5.1.3.1. Sexo y edad de presentación

En el subgrupo de pacientes con debut precoz (antes de los 50 años), la proporción era favorable hacia las mujeres con 4 mujeres frente a 2 varones. En los pacientes con debut tardío (después de los 50 años), la proporción se veía invertida con 14 varones frente a 9 mujeres.

No existían diferencias significativas en la distribución por sexo de acuerdo con la edad de aparición de MG ($P=0,364$) (**tabla 5**).

	Hombres	Mujeres	Total	
MG de inicio precoz	2	4	6	
MG de inicio tardío	14	9	23	
Total	16	13	29	$P=0,364$

Tabla 5. Distribución por sexo de acuerdo con el inicio de síntomas de MG. P evaluado con el test exacto de Fisher.

5.1.3.2. Sexo y forma clínica de presentación

En el subgrupo de MG ocular, 14 (74%) de 19 pacientes son varones y 5 (26%) de 19 mujeres. En el subgrupo de MG generalizada, 2 (20%) de 10 pacientes son hombres y 8 (80%) de 10 pacientes mujeres.

Inversamente, de los 16 varones, 14 pacientes (88%) se presentaron con síntomas oculares y 2 pacientes (12%) se presentaron con síntomas generales. De las 13 mujeres, 5 pacientes (38%) se presentaron con síntomas oculares y 8 pacientes (62%) se presentaron con síntomas generales.

Existían diferencias significativas en la distribución por sexo de acuerdo con la forma clínica de MG ($P=0,016$) (**tabla 6**).

	Hombres	Mujeres	Total	
MG ocular	14	5	19	
MG generalizada	2	8	10	
Total	16	13	29	$P=0,016$

Tabla 6. Distribución por sexo de acuerdo con la forma clínica de MG. P evaluado con el test exacto de Fisher.

5.1.4. Gravedad de la enfermedad

Diecinueve (66%) de los 29 pacientes tenían MG ocular (Clase I de la escala MGFA). Diez de los 29 pacientes (33%) tenían MG generalizada (Clase II, III, IV y V de la escala MGFA) (**tabla 7**).

Clase MGFA	N	%
MGFA I	19	66
MGFA II	5	17
MGFA III	3	10
MGFA IV	2	7
MGFA V	0	0

Tabla 7. Distribución de los pacientes de acuerdo con la clase de la MGFA. N: número de pacientes. MGFA: Myasthenia Gravis Foundation of America.

Cuatro pacientes fueron clasificados con II-B, 1 paciente con II-A, 2 pacientes con III-B, 1 paciente con estadio IVA y 1 un paciente con IVB. En los pacientes con MG generalizada, la mayoría de ellos tenían sintomatología bulbar predominante (80%) (tabla 8).

	A, N (%)	B, N (%)	Total, N (%)
MGFA II	1 (10)	4 (40)	5 (50)
MGFA III	0 (0)	3 (30)	3 (30)
MGFA IV	1 (10)	1 (10)	1 (20)
MGFA V	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	2 (20)	8 (80)	10 (100)

Tabla 8. Distribución de los pacientes con MG generalizada de acuerdo con la clase de la escala de la MGFA y su sintomatología predominante. A: axial y extremidades. B: bulbar. N: número de pacientes. MGFA: Myasthenia Gravis Foundation of America.

5.1.5. Seropositividad anti-AChR

Veinticuatro (83%) de 29 pacientes presentaban en suero autoanticuerpos anti-AChR. Cinco (17%) de 29 pacientes no presentaban en suero autoanticuerpos anti-AChR ni anti-MuSK clasificándose como seronegativos.

Los datos de los valores del título de anti-AChR no seguían una distribución normal ($P=0,133$, test de Kolmogorov-Smirnov). Se muestra a continuación el gráfico Q-Q para los valores de anti-AChR séricos en los pacientes seropositivos (**figura 7**).

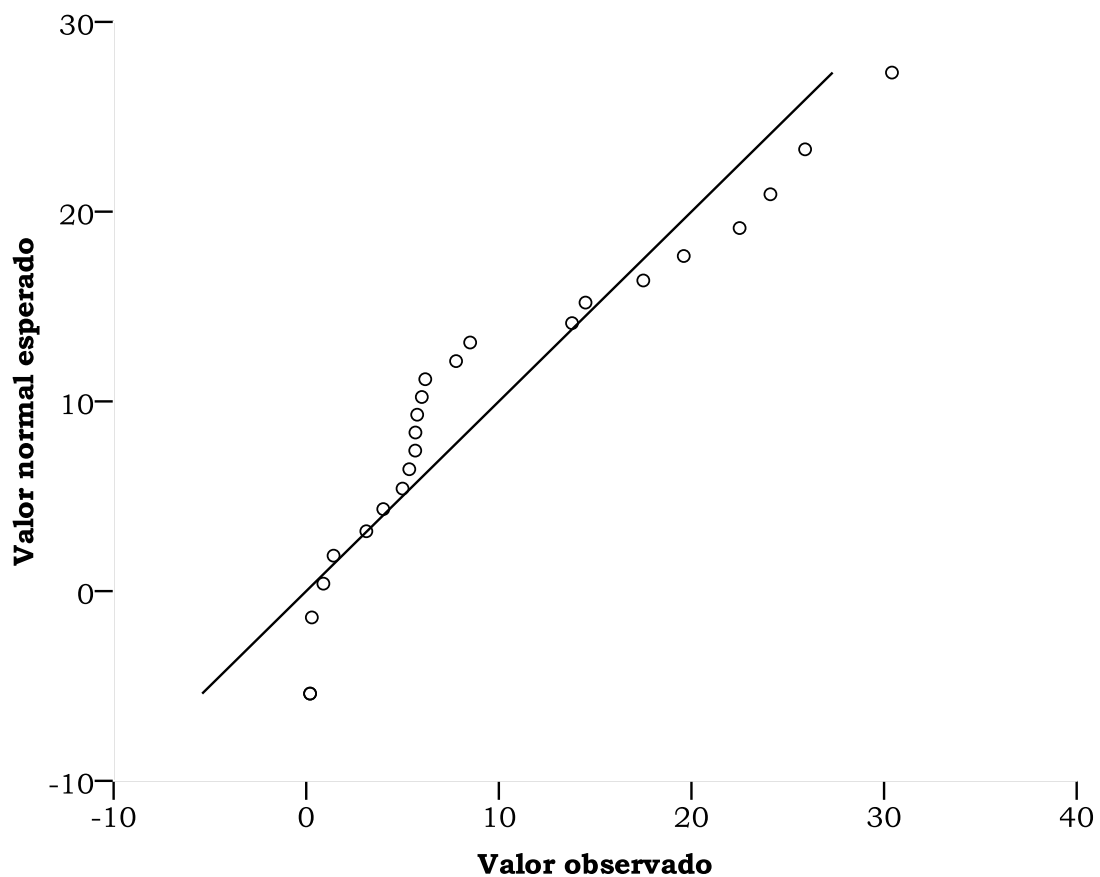


Figura 7. Gráfico Q-Q de los niveles séricos de anti-AChR en los 24 pacientes seropositivos. Los valores son expresados en nmol/l.

La mediana era de 5,9 nmol/l. La amplitud intercuartil era de 13,4 nmol/l. El rango era 0,2 nmol-30,2 nmol/l.

La distribución del título de anticuerpos es mostrado en el siguiente gráfico (**figura 8**).

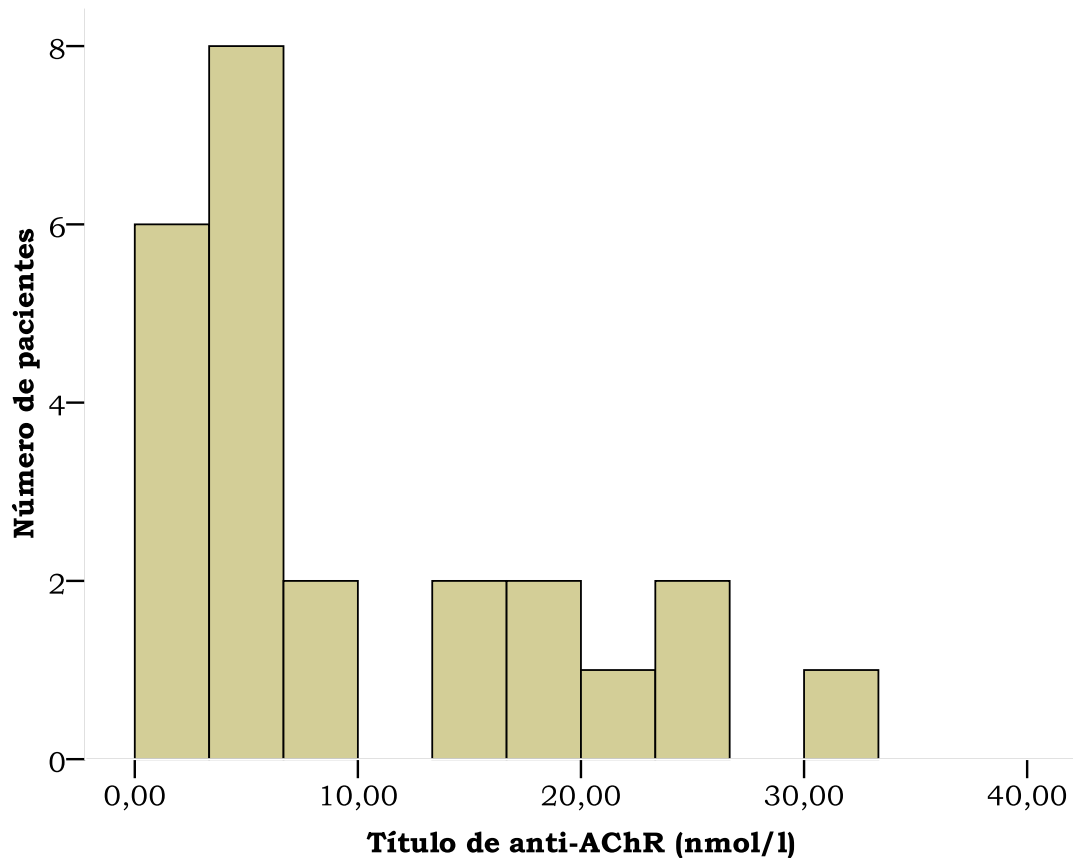


Figura 8. Niveles de anti-AChR en pacientes con MG. Las concentraciones séricas son expresadas en nmol/l en el eje X. El eje Y representa el número de pacientes.

5.1.5.1. Seropositividad y edad de debut

No existían diferencias significativas ($P=0,108$) entre la seropositividad para anti-AChR y la edad de inicio de síntomas de MG (**tabla 9**).

Seis (25%) de 24 pacientes seropositivos presentaban un debut precoz frente a los 18 pacientes (75%) que presentaban un debut tardío. De los 5 pacientes seronegativos,

todos ellos presentaron un debut tardío. Todos los pacientes con debut precoz eran seropositivos. Dieciocho (78%) de 23 pacientes con debut tardío eran seropositivos.

	Debut precoz	Debut tardío	Total	
Anti-AChR (+)	6	18	24	
Anti-AChR (-)	0	5	5	
Total	6	23	29	<i>P=0,108</i>

Tabla 9. Seropositividad de acuerdo con la edad de debut en la cohorte de pacientes. Debut precoz (antes de los 50 años). Debut tardío (después de los 50 años). *P* evaluada con el test de Fisher.

5.1.5.2. Seropositividad y forma de MG

No existían diferencias significativas ($P=1,000$) entre la presencia de anti-AChR en suero y la forma clínica de MG (ocular y generalizada) (**tabla 10**).

Dieciséis (84%) de 19 pacientes con MG ocular eran seropositivos frente al 16% de pacientes ($n=3$) con MG ocular seronegativos. Ocho (80%) de 10 pacientes con MG generalizada eran seropositivos frente a 2 (20%) de 10 pacientes con MG generalizada que eran seronegativos.

	MG ocular	MG generalizada	Total	
Anti-AChR (+)	16	8	24	
Anti-AChR (-)	3	2	5	
Total	19	10	29	<i>P</i> =1,000

Tabla 10. Seropositividad de acuerdo con forma de presentación en la cohorte de pacientes. *P* evaluada con el test de Fisher.

5.1.5.3. Seropositividad y sexo

No existen diferencias significativas entre la presencia en suero de anti-AChR y el género (*P*=1,000) (**tabla 11**).

En hombres, 13 (81%) de 16 pacientes eran seropositivos. En mujeres, 11 (19%) de 13 pacientes eran seropositivos. La proporción hombre:mujer en pacientes seronegativos es 13:11=1,18. La proporción hombre:mujer en pacientes seronegativos es 3:2=1,50.

	Hombres	Mujeres	Total	
Anti-AChR (+)	13	11	24	
Anti-AChR (-)	3	2	5	
Total	16	13	29	<i>P</i> =1,000

Tabla 11. Seropositividad de acuerdo con el sexo en la cohorte de pacientes. *P* evaluada con el test de Fisher.

5.1.5.4. Seropositividad y autoanticuerpos nucleares

No existían diferencias significativas entre la presencia de anti-AChR en suero de pacientes con MG y la presencia en suero de autoanticuerpos nucleares ($P=0,296$) (tabla 12).

Siete (29%) de 24 pacientes seropositivos presentaban en suero autoanticuerpos nucleares. 17 (71%) de 24 pacientes seropositivos no presentaban en suero autoanticuerpos nucleares. Ninguno de los pacientes seronegativos ($n=5$) presentaba en suero autoanticuerpos nucleares. Inversamente, 7 (24%) de 29 pacientes presentaban en suero autoanticuerpos nucleares y todos ellos eran seropositivos para anti-AChR.

	AAN (-)	AAN (+)	Total	
Anti-AChR (+)	17	7	24	
Anti-AChR (-)	5	0	5	
Total	22	7	29	$P=0,296$

Tabla 12. Seropositividad de acuerdo con la presencia de autoanticuerpos nucleares en la cohorte de pacientes. AAN: autoanticuerpos nucleares. P evaluada con el test de Fisher.

5.1.5.5. Título de anti-AChR y forma de MG

Al comparar el título de anti-AChR (en los pacientes seropositivos) entre el grupo con MG ocular y MG generalizada se encontraron diferencias significativas ($5,2 \pm 4,8$

nmol/l para MG ocular, $18,9 \pm 8,7$ nmol/l para MG para MG generalizada; $P < 0,001$).

Los datos son mostrados en el siguiente gráfico (**figura 9**).

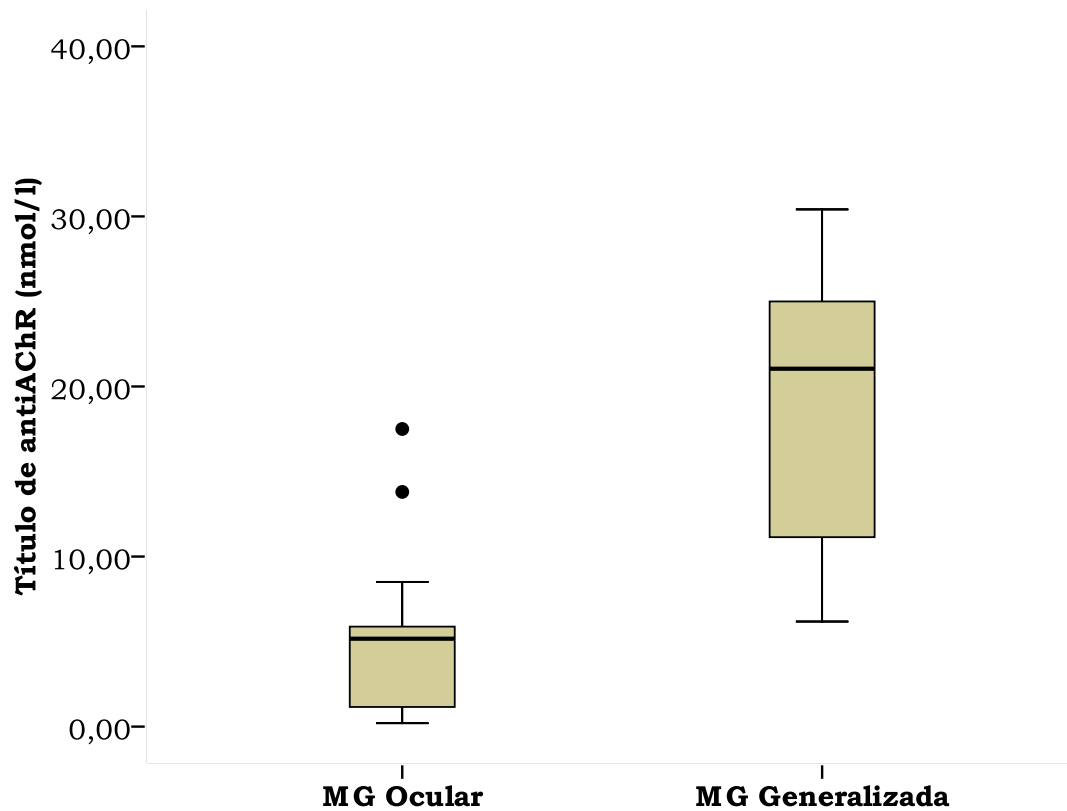


Figura 9. Niveles séricos de anti-AChR (nmol/l) en pacientes con MG clasificados de acuerdo con la forma clínica: MG ocular, MG generalizada.

5.1.5.6. Título de anti-AChR y edad de debut de MG

No existían diferencias significativas entre el grupo con MG de inicio precoz ($8,4 \pm 10,6$ nmol/L) frente a la MG de inicio tardío ($10,2 \pm 8,7$ nmol/L, $P=0,301$). Los datos son mostrados en la siguiente gráfica (**figura 10**).

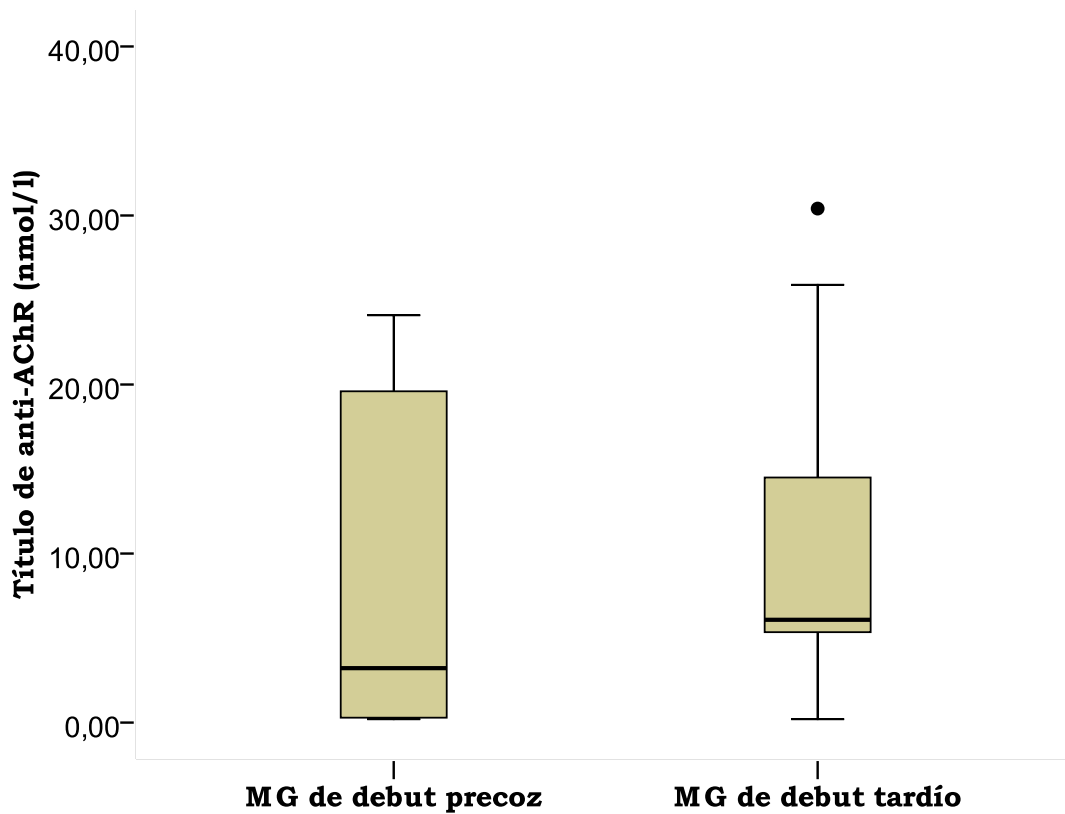


Figura 10. Niveles séricos de anti-AChR (nmol/l) en pacientes con MG de acuerdo con el debut de aparición de síntomas. MG de debut precoz (antes de los 50 años). MG de debut tardío (después de los 50 años).

5.1.5.7. Título de anti-AChR y sexo

No existían diferencias significativas ($P=0,325$) en el título de autoanticuerpos anti-AChR entre los hombres ($7,2 \pm 5,6$ nmol/l) y las mujeres ($12,8 \pm 11,5$ nmol/l).

Los datos son mostrados en el siguiente gráfico (**figura 11**).

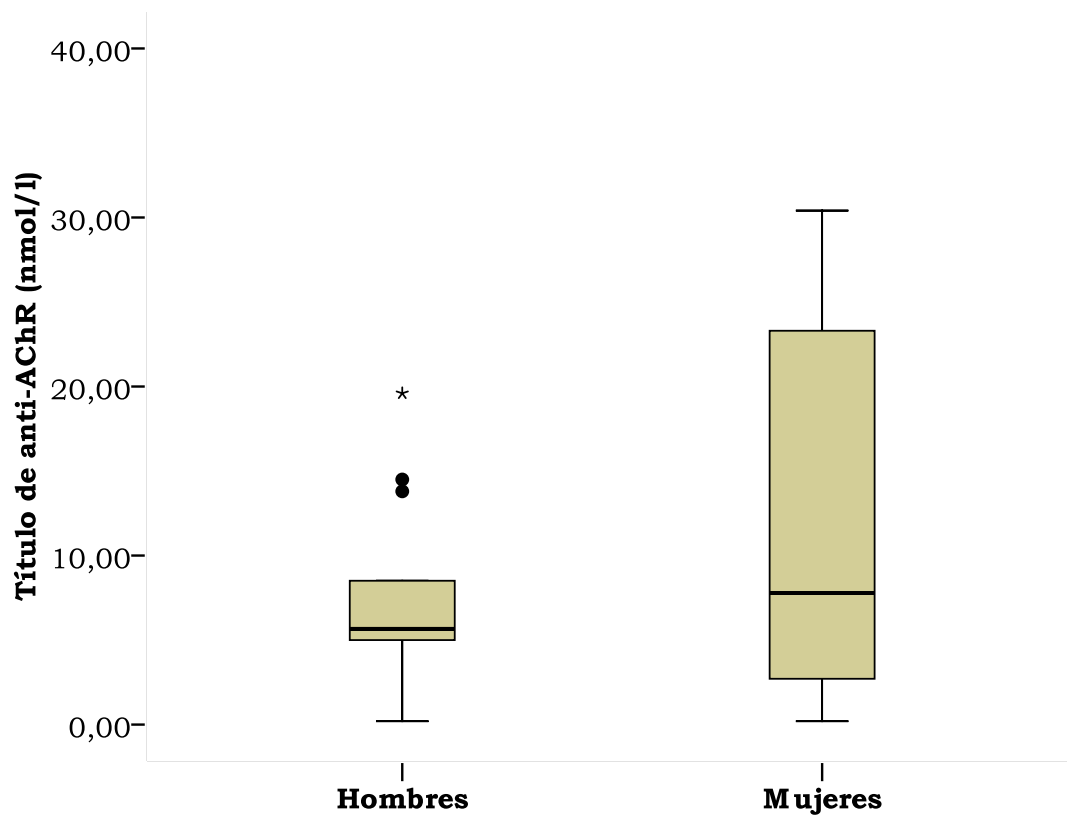


Figura 11. Niveles séricos de anti-AChR (nmol/l) en pacientes con MG distribuidos por género.

5.1.5.8. Título de anti-AChR y autoanticuerpos nucleares

Existían diferencias, aunque no llegaban a la significación estadística ($P=0,070$) entre el grupo de pacientes con presencia de autoanticuerpos nucleares ($15,0 \pm 11,0$ nmol/l) frente a los pacientes sin presencia de estos autoanticuerpos nucleares ($7,6 \pm 7,4$ nmol/l).

Los datos son mostrados en el siguiente gráfico (**figura 12**).

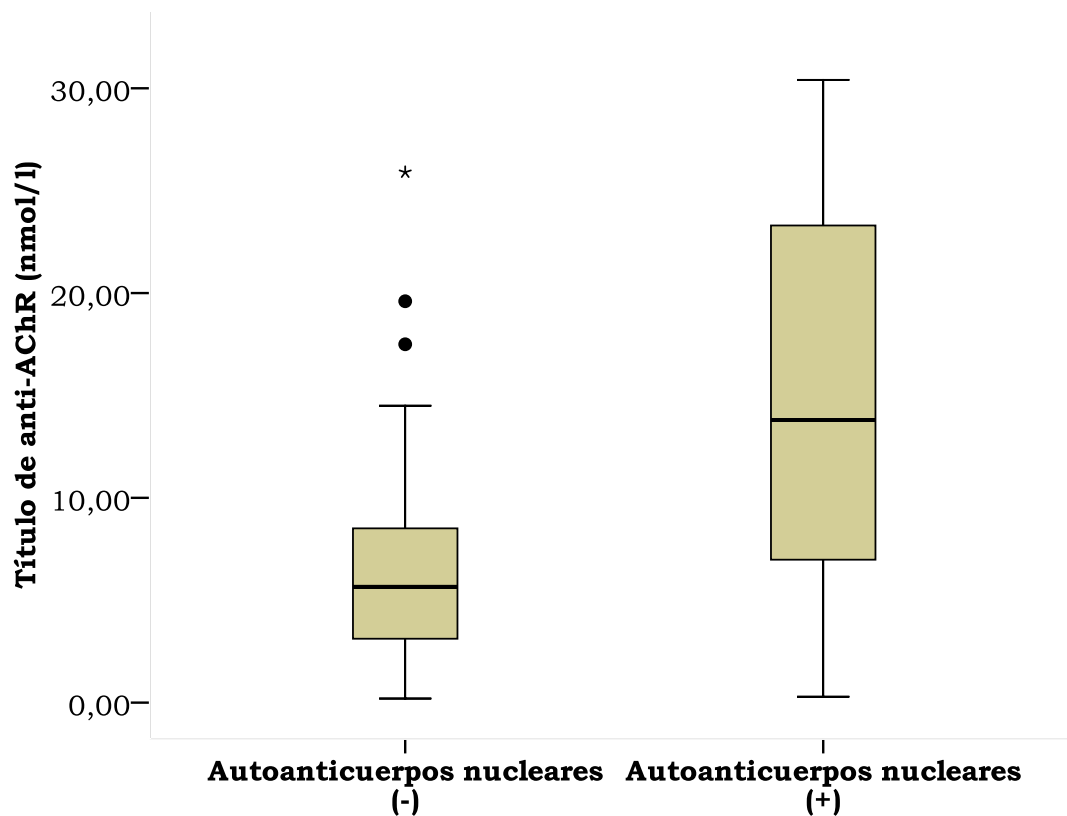


Figura 12. Niveles séricos de anti-AChR (nmol/l) en pacientes con MG de acuerdo con la presencia o no de autoanticuerpos nucleares en suero.

5.1.6. Timoma

Dos pacientes presentaron patología tímica asociada. Una de estas pacientes (**Anexo V. Caso n°.5**) presentó un timoma que fue intervenido sin mostrar signos de malignidad. La otra paciente (**Anexo V. Caso n°.3**) mostró signos radiológicos compatibles con hiperplasia tímica. Los controles radiológicos no mostraron cambios significativos.

Ambos pacientes eran mujeres, con MG generalizada y con anti-AChR presentes en suero con títulos altos (22,5 y 24,1 nmol/l). En ambos casos el control sintomático requería el empleo de tratamiento inmunomodulador o inmunosupresor a lo largo de su

evolución. La paciente con timoma presentó un debut precoz de la enfermedad, mientras que la paciente con hiperplasia tímica formaba parte del grupo de debut tardío de la enfermedad (**Anexo V**).

5.1.7. Otras enfermedades autoinmunes

Cuatro (14%) de 29 pacientes presentaban otros trastornos autoinmunes: 2 (7%) casos de tiroiditis autoinmune, 1 caso (3%) con anemia perniciosa, 1 paciente (3%) con artritis reumatoide y 1 paciente (3%) con lupus eritematosos sistémico. Existía una paciente con tiroiditis autoinmune y lupus eritematoso sistémico de manera simultánea (**Anexo V. Caso nº5**).

5.1.7.1. Enfermedades autoinmunes y forma de MG

No existen diferencias significativas ($P=0,105$) entre la presencia de aparición de otras condiciones autoinmunes y la forma clínica de MG.

Entre los pacientes con MG ocular, 1 paciente (6%) de 18 casos presenta otras enfermedades autoinmunes. Entre los pacientes con MG generalizada, 3 (30%) de 10 pacientes presenta otras condiciones autoinmunes. Los datos son mostrados en la **tabla 13**.

	Autoinmunes (+)	Autoinmunes (-)	Total	
MG ocular	1	18	19	
MG generalizada	3	7	10	
Total	4	25	29	$P=0,105$

Tabla 13. Frecuencia de pacientes con enfermedades autoinmunes de acuerdo con la forma clínica de MG: MG ocular y MG generalizada.

5.1.7.2. Enfermedades autoinmunes y edad de presentación

No existían diferencias significativas ($P=0,180$) entre la presencia de aparición de otras condiciones autoinmunes y la edad de presentación clínica: MG de debut precoz (antes de los 50 años) y MG de debut tardío (después de los 50 años).

Entre los pacientes con debut precoz, 2 (33%) de 6 casos presentaba otras enfermedades autoinmunes. Entre los pacientes con debut tardío, 1 (8%) de 23 pacientes presentaba otras condiciones autoinmunes.

Los datos son mostrados en la **tabla 14**.

	Autoinmunes (+)	Autoinmunes (-)	Total	
MG debut precoz	2	4	6	
MG debut tardío	2	21	23	
Total	4	25	29	$P=0,180$

Tabla 14. Frecuencia de pacientes con enfermedades autoinmunes de acuerdo con la edad de presentación de la enfermedad.

5.1.7.3. Enfermedades autoinmunes y sexo

No existían diferencias significativas ($P=1,000$) entre la presencia de aparición de otras condiciones autoinmunes y el sexo.

Entre los pacientes varones, 2 pacientes (13%) de 16 casos presentaba otras enfermedades autoinmunes. Entre las mujeres, 2 (15%) de 13 pacientes presentaba otras condiciones autoinmunes. Los datos son mostrados en la **tabla 15**.

	Autoinmunes (+)	Autoinmunes (-)	Total	
Hombres	2	14	16	
Mujeres	2	11	13	
Total	4	25	29	<i>P=1,000</i>

Tabla 15. Frecuencia de pacientes con enfermedades autoinmunes distribuidos en función del sexo.

5.1.7.4. Enfermedades autoinmunes y seropositividad

No existían diferencias significativas ($P=1,000$) entre la presencia de aparición de otras condiciones autoinmunes y la presencia en suero de anti-AChR.

Entre los pacientes seropositivos, 4 pacientes (17%) de 24 casos presentaba otras enfermedades autoinmunes. Entre los pacientes seronegativos ninguno de los pacientes ($n=5$) presentaba otras condiciones autoinmunes. Los datos son mostrados en la **tabla 16**.

	Autoinmunes (+)	Autoinmunes (-)	Total	
Seropositivos	4	20	24	
Seronegativos	0	5	5	
Total	4	25	29	<i>P=1,000</i>

Tabla 16. Frecuencia de pacientes con enfermedades autoinmunes distribuidos en función de la presencia o no de anticuerpos anti-AChR.

5.1.7.5. Coexistencia de varias condiciones autoinmunes

Una paciente (3%) de entre los 29 fue diagnosticada de forma sincrónica de lupus eritematoso sistémico y MG. Esta era la única paciente que cumplía la suma de estas características: mujer, debut precoz, MG generalizada.

5.1.8. Neoplasias asociadas

Tres pacientes (**Anexo V. Casos n°.4, n°.15 y n°.25**) presentaron una neoplasia previa o simultánea al diagnóstico de MG: una mujer previamente diagnosticada hacía más de 10 años de neoplasia de mama, un varón con antecedente de Linfoma no Hodgkin extratímico y un varón en el que se diagnosticó un adenocarcinoma gástrico en el ingreso del debut sintomático de la MG. No consideramos en este apartado a la paciente que presentó un timoma (**Anexo V. Caso n°.5**).

5.1.8.1. Linfoma no Hodgkin. Caso n°.25.

El caso n°.25 (**Anexo V**) fue diagnosticado de linfoma no Hodgkin folicular de bajo grado hace más de 15 años al presentar un síndrome adenopático generalizado.

Las exploraciones iniciales constataron adenomegalias en todas las localizaciones (laterocervicales, axilares e inguinales) sin grandes masas, esplenomegalia ni hepatomegalia. Las pruebas de imagen mostraban adenopatías axilares bilaterales (la mayor de 2 cm), adenopatías retroperitoneales de menos de 5mm, y pequeñas adenopatías en cadena paratraqueal derecha. El hígado estaba moderadamente aumentado de tamaño por esteatosis. Dada la estabilidad clínica y radiológica se ha mantenido sin tratamiento hasta la fecha actual.

Desde un punto de vista neurológico, el paciente presentó sintomatología compatible con MG ocular, clase I de la MGFA con buena respuesta a piridostigmina (240 mg/día). Los anti-AChR no estaban presentes en suero. Meses después del inicio del diagnóstico, presentó episodio de ptosis total y debilidad masticatoria propiciando el inicio de tratamiento con dosis bajas de prednisona con buena tolerancia y eficacia. No se ha constatado timoma en ninguna de las pruebas de imagen solicitadas durante el seguimiento.

5.1.8.2. Adenocarcinoma gástrico. Caso n°.15.

El paciente n°.15 (**Anexo V**) ingresó de forma urgente por pérdida de fuerza progresiva en extremidades, sin sintomatología bulbar u ocular. No había síndrome constitucional ni dolor. En el ingreso se detectó rabdomiólisis y debilidad proximal en extremidades superiores e inferiores 3/5, así como debilidad en musculatura flexora cervical 2/5 con fatigabilidad evidente.

Se inició tratamiento con Inmunoglobulinas IV y piridostigmina con recuperación en fuerza que permite al paciente volver a deambular. El TAC cerebral era normal y la electromiografía de fibra única (realizada con tratamiento anticolinesterásico) fue normal. Los anti-AchR fueron positivos con un título de 14,50 nmol /l confirmándose el diagnóstico de Miastenia Gravis Autoinmune, clase IV-A.

En el ingreso apareció una hemorragia digestiva alta encontrándose en la gastroscopia en cara posterior de cuerpo bajo gástrico una úlcera de aspecto neoplásico que afectaba a curvatura menor e incisura, recogándose muestra para biopsia. El estudio anatomopatológico era compatible con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. El PET-TAC mostró adenopatías en el ligamento gastrohepático de hasta 1,43 cm de

diámetro, con refuerzo en la fijación de glucosa, SUV mx. 2.32. Adenopatías mesentéricas subcentimétricas, que no captan glucosa, SUV máx. 1.44, comportándose metabólicamente como reactivas. Como consecuencia del estudio de extensión se definió a la enfermedad como un estadio T2-3 N+ (adenopatías en el ligamento gastrohepático-pericelíacas).

Fue intervenido quirúrgicamente realizándose una gastrectomía subtotal, con reconstrucción en Y de Roux. En el acto quirúrgico se objetivó una neoplasia a nivel del antro pilórico, reseccable, sin identificar macroscópicamente la presencia de lesiones ocupantes de espacio ni en hígado ni en el resto de la cavidad peritoneal.

El estudio de la pieza anatómica mostró un adenocarcinoma gástrico enteroide de 3 x 2 cm con márgenes libres. Grado histológico 3, poco diferenciado. Invadía localmente el epiplón menor. Número de ganglios aislados: 12; número de ganglios metastatizados :6. No había invasión venosa ni invasión de linfáticos perineurales. La clasificación p-TNM correspondía a un pT3-N2. El estudio de la valoración de inmunorreactividad para Hercep-test fue positivo 2+ sin amplificación por FISH.

A los 19 meses de seguimiento el paciente se encuentra estable con buen estado general con buena tolerancia al tratamiento con capecitabina (Xeloda®), pero presentando en pruebas de imagen una lesión ocupante de espacio hepática de 14 mm en segmento VII del lóbulo hepático derecho de nueva aparición y múltiples nódulos (el mayor mide 23 mm, adyacente al borde hepático izquierdo) sugestivos de implantes tumorales o adenopatías. El tratamiento actual para la enfermedad autoinmune consiste en piridostigmina.

5.1.9. Autoanticuerpos

7 (24%) de los 29 pacientes presentaban en suero positividad para al menos alguno de los autoanticuerpos nucleares estudiados: ANAs, ASMA, ANA, PACA, DNA, Ro, La, Sm, Jo, RNP, Scl 70.

5.1.9.1. Autoanticuerpos y forma de MG

Existen diferencias significativas ($P=0,030$) entre la presencia de aparición de otras condiciones autoinmunes y la forma clínica de MG.

Entre los pacientes con MG ocular, 2 pacientes (11%) de 19 casos presenta autoanticuerpos nucleares en suero. Entre los pacientes con MG generalizada, 5 (50%) de 10 pacientes presenta autoanticuerpos nucleares en suero. Los datos son mostrados en la **tabla 17**.

	AAN (+)	AAN (-)	Total	
MG ocular	2	17	19	
MG generalizada	5	5	10	
Total	7	25	29	$P=0,030$

Tabla 17. Frecuencia de pacientes con autoanticuerpos nucleares de acuerdo con la forma clínica de MG: MG ocular y MG generalizada. AAN: autoanticuerpos nucleares. P evaluada con el test exacto de Fisher.

5.1.9.2. Autoanticuerpos nucleares y edad de presentación

No existen diferencias significativas ($P=0,612$) entre la presencia de autoanticuerpos nucleares en suero y la edad de presentación clínica: MG de debut precoz (antes de los 50 años) y MG de debut tardío (después de los 50 años).

	AAN (+)	AAN (-)	Total	
MG debut precoz	4	2	6	
Mg debut tardío	3	20	23	
Total	7	22	29	$P=0,612$

Tabla 18. Autoanticuerpos nucleares de acuerdo con la edad de presentación de la enfermedad: MG debut precoz (antes de los 50 años). MG debut tardío (después de los 50 años). AAN: autoanticuerpos nucleares. P evaluado con el test exacto de Fisher.

Entre los pacientes con debut precoz, el porcentaje de pacientes con presencia en suero de autoanticuerpos nucleares es del 67%, con 4 de 6 pacientes con debut precoz. Entre los pacientes con debut tardío, 3 de 23 (13%) pacientes presenta autoanticuerpos nucleares.

5.1.9.3. Autoanticuerpos nucleares y sexo

Existen diferencias significativas ($P=0,026$) entre la presencia de aparición de otras condiciones autoinmunes y el sexo.

Entre los pacientes varones, 1 pacientes (6%) de 16 casos presenta autoanticuerpos nucleares en suero. Entre las mujeres, 6 (46%) de 13 pacientes presenta otras condiciones autoinmunes. Los datos son mostrados en la **tabla 19**.

	AAN (+)	AAN (-)	Total	
Hombres	1	15	16	
Mujeres	6	7	13	
Total	7	22	29	<i>P=0,026</i>

Tabla 19. Frecuencia de pacientes con autoanticuerpos nucleares en suero distribuidos en función del sexo. AAN: autoanticuerpos nucleares.

P evaluada con el test exacto de Fisher.

5.1.10. Respuesta al tratamiento

A los 6 meses de evolución desde el diagnóstico de la enfermedad, los fármacos empleados son: 2 pacientes (7%) estaban libres de medicación, piridostigmina era empleada en 27 pacientes (93%), prednisona era empleada en 11 pacientes (38%), azatioprina era empleada en 3 pacientes (10%), metotrexate era empleada en 1 paciente (3%), inmunoglobulina IV era empleada en 4 pacientes (14%). Los datos referentes a los fármacos empleados son detallados en la siguiente tabla (**tabla 20**).

Fármaco	N, (%)	Dosis empleada
Ninguno	2 (7)	-
Piridostigmina	27 (93)	60-240 mg
Prednisona	11 (38)	5-60 mg
Azatioprina	3 (10)	150-200 mg
Metotrexate	1 (3)	X
IVIg	4 (14)	2g/Kg

Tabla 20. Empleo de fármacos en la cohorte entera con MG.

5.1.11. Diagnóstico

Veinticuatro (83%) de 29 pacientes fueron diagnosticados con una clínica compatible y una serología positiva en sangre. De los 5 pacientes seronegativos, 2 (7%) fueron diagnosticados con una respuesta positiva al test de Anticude® (mediante la evaluación doble ciego de la ptosis palpebral) y 3 (10%) pacientes fueron diagnosticados con electrofisiología (estimulación nerviosa repetitiva).

Los datos son mostrados en la siguiente tabla (**tabla 21**).

Criterio diagnóstico empleado	N	%
Serológico	24	83
Anticude®	2	7
Electrofisiológico	3	10

Tabla 21. Criterio empleado en el diagnóstico de MG. N: número de pacientes.

5.1.11.1 Aperistalsis esofágico. Caso n°.22.

Paciente mujer de 79 años de edad (**Anexo V. Caso n°.22**), sin antecedentes personales ni familiares de interés, con una historia desde hacía 2 meses de disfagia mantenida y progresiva, fundamentalmente para líquidos. No relataba fatigabilidad.

Inicialmente, ingresó en el servicio de digestivo donde se había descartado patología local, mediante gastroscopia, laringoscopia y TC toraco-abdominal. La afectación era grave, habiendo perdido más de 10 kg desde el inicio del cuadro. No presentaba trastorno del lenguaje ni disnea. No refería ningún otro síntoma.

En la exploración, los pares craneales eran normales. El reflejo nauseoso estaba presente. El arco paladar era normal y simétrico. No había diplopía ni ptosis. Tampoco había atrofia ni fasciculaciones en la lengua. Existía una leve debilidad en la flexión cervical, 4/5, sin clara fatigabilidad, y la musculatura de cinturas era normal. No había trastorno sensitivo ni de la coordinación. Los reflejos de estiramiento muscular eran normales y los reflejos cutaneoplantares eran flexores.

La bioquímica que incluía hormonas tiroideas, lactato, creatincinasa, mioglobina, cortisol, proteinograma, marcadores tumorales fue normal. En el estudio electrofisiológico, realizando estimulación repetitiva del nervio espinal derecho con

estímulo retrocleidomastoideo y recogida en músculo trapecio a 3 Hz y 20 Hz, se observó un decremento patológico a los 3 min de la estimulación tetanizante. El EMG de los músculos deltoides, orbiculares de los ojos, masetero y orbicular de los labios derechos no mostraba actividad espontánea y los potenciales de unidad motora (PUM) eran normales. La RM cerebral fue normal. Los anticuerpos anti-AChR fueron positivos (30,40 nmol/l, normal < 0,15 nmol/l). No se demostró timoma en la TC torácico.

Se realizó un estudio manométrico esofágico que mostraba una presión en el esfínter esofágico inferior (EEI) normal (11,6 mmHg), con buena relajación con la deglución (presión residual: -4,9 mmHg). En el cuerpo se demostraba ausencia de ondas peristálticas con las degluciones, con una presión basal normal, no elevada. La presión del EES era algo baja (13,8 mmHg), con buena relajación en la deglución y de forma coordinada con la contracción faríngea. La amplitud de la contracción faríngea era normal. En resumen, existía una alteración motora grave con aperistalsis esofágica con esfínter EEI normal y sin alteración motora faringo-esofágica.

Con el diagnóstico de MG se inició tratamiento con piridostigmina (60 mg cada 6 h) con evidente mejoría de la disfagia, tanto para sólidos como para líquidos. Actualmente, la paciente se encuentra estable, sin presentar nuevas recaídas y controlada con piridostigmina (240 mg/día) y prednisona (15 mg/día).

5.2. Sección II: inmunología

5.2.1. Interferon- γ

5.2.1.1. Interferon- γ en pacientes y controles

Los niveles séricos de IFN- γ estaban elevados en los pacientes con MG ($8,43 \pm 15,62$ pg/ml) comparados con los niveles séricos de los controles ($3,20 \pm 0,00$ pg/ml, $P=0,027$).

5.2.1.2. Interferon- γ y edad de presentación

No existían diferencias entre los valores séricos de IFN- γ y la edad de presentación ($P=0,963$) (tabla 22).

	Debut precoz (n=4)	Debut tardío (n=21)	<i>P</i>
IFN- γ (pg/ml)	$13,20 \pm 19,99$	$7,52 \pm 15,08$	0,963

Tabla 22. Niveles de IFN- γ entre el grupo de pacientes con debut precoz (menores de 50 años) y pacientes con debut tardío (mayores de 50 años). *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.1.3. Interferon- γ y sexo

No existían diferencias entre los valores séricos de IFN- γ entre los pacientes de sexo masculino y femenino ($P=0,706$) (tabla 23).

	Hombres (n=12)	Mujeres (n=13)	<i>P</i>
IFN- γ (pg/ml)	$4,66 \pm 3,04$	$11,91 \pm 21,26$	0,706

Tabla 23. Niveles de IFN- γ en el grupo de pacientes distribuidos según el sexo. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.1.4. Interferon- γ y forma clínica

Al clasificar a los sujetos en tres grupos: MG generalizada, MG ocular y controles, encontramos diferencias significativas en los niveles de IFN- γ ($P=0,022$) (**tabla 24**).

	MG generalizada	MG ocular	Controles	<i>P</i>
IFN-γ (pg/ml)	15,79 \pm 24,97	4,29 \pm 2,69	3,20 \pm 0,00	0,022

Tabla 24. Niveles de IFN- γ en el grupo de pacientes y controles. *P* evaluada con el test de Kruskal-Wallis.

La concentración de IFN- γ era significativamente mayor en pacientes con MG generalizada (15,79 \pm 24,97 pg/ml) en comparación con la de los controles (3,20 \pm 0,00, $P=0,006$).

Había una tendencia hacia niveles séricos elevados en los pacientes con MG ocular (4,29 \pm 2,69 pg/ml) en comparación con los niveles de los controles ($P=0,083$).

También existía una tendencia, no significativa, al comparar niveles entre el grupo con MG ocular y MG generalizada ($P=0,163$) (**tabla 25**).

	MG generalizada	MG ocular	<i>P</i>
IFN-γ (pg/ml)	15,79 \pm 24,97	4,29 \pm 2,69	0,163

Tabla 25. Comparación de niveles séricos de IFN- γ entre el grupo de pacientes con MG generalizada y pacientes con MG ocular. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.1.5. Interferon- γ y timo

En la cohorte entera de pacientes con MG, los niveles séricos de IFN- γ estaban elevados en los pacientes con anormalidades tímicas ($57,83 \pm 21,71$ pg/ml) comparados con aquellos pacientes sin enfermedad del timo ($4,14 \pm 2,36$ pg/ml, $P=0,004$).

5.2.1.6. Interferon- γ y seropositividad

No existían diferencias entre los valores séricos de IFN- γ entre la presencia o no en suero de anti-AChR ($P=0,607$) (tabla 26).

	Seropositivos (n=20)	Seronegativos (n=5)	<i>P</i>
IFN- γ (pg/ml)	$9,55 \pm 17,35$	$3,98 \pm 1,74$	0,607

Tabla 26. Niveles de IFN- γ entre el grupo de pacientes seropositivos y seronegativos. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.1.7. Interferon- γ y anti-AChR en suero

No encontramos correlación entre los niveles séricos de IFN- γ con el título de anti-AChR (coeficiente de correlación=0,038 Rho de Spearman, $P=0,872$) en los 20 pacientes seropositivos.

5.2.1.8. Interferon- γ y otras condiciones autoinmunes

Existían diferencias significativas entre los valores séricos de IFN- γ entre los pacientes con MG que presentaban otras enfermedades autoinmunes comparados con los niveles de pacientes sin otras enfermedades autoinmunes ($P=0,001$) (tabla 27).

	Autoinmunes (+) (n=3)	Autoinmunes (-) (n=22)	<i>P</i>
IFN-γ (pg/ml)	42,93 \pm 29,67	3,73 \pm 1,34	0,001

Tabla 27. Niveles de IFN- γ entre el grupo de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y pacientes sin otras enfermedades autoinmunes. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.1.9. Interferon- γ y autoanticuerpos nucleares en suero

No existían diferencias entre los valores séricos de IFN- γ entre los pacientes con o sin autoanticuerpos nucleares ($P=0,252$) (tabla 28).

	AAN (+) (n=7)	AAN (-) (n=18)	<i>P</i>
IFN-γ (pg/ml)	18,83 \pm 27,95	4,39 \pm 2,63	0,252

Tabla 28. Niveles de IFN- γ entre el grupo de pacientes con autoanticuerpos nucleares o no en suero. AAN: autoanticuerpos nucleares. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.1.10. Interferon- γ y complemento

Correlaciones entre el título de IFN- γ con los niveles de C4, C5 y C9 fueron significativas: con C4, $r=-0,445$, $P=0,005$; con C5, $r=-0,379$, $P=0,019$; con C9, $r=0,385$,

$P=0,017$). No existía relación entre los niveles de C3 y el título de IFN- γ ($P=0,424$). Se muestran los datos en la siguiente tabla.

5.2.1.11. Interferon- γ y citocinas

Existía una fuerte correlación positiva entre los niveles séricos de IFN- γ e IL-17 en los pacientes con MG ($r=0,838$; $P<0,001$) (tabla 29).

	sCD40L	TNF- α	IL-17
Coefficiente correlación (Rho de Spearman)	-0,287	-0,049	0,838
P	0,080	0,763	0,001

Tabla 29. Correlaciones entre los niveles de IFN- γ y otras citocinas estudiadas.

5.2.2. TNF- α

5.2.2.1. TNF- α en pacientes y controles

No existían diferencias significativas entre los niveles séricos de TNF- α entre el grupo de pacientes ($6,54 \pm 2,71$ pg/ml) y el grupo control ($6,22 \pm 2,65$ pg/ml).

5.2.2.2. TNF- α y edad de presentación

No había diferencias en los niveles de TNF- α entre la MG de debut precoz ($5,20 \pm 3,78$ pg/ml) y la MG de debut tardío ($6,79 \pm 2,49$ pg/ml, $P=0,204$).

5.2.2.3. TNF- α y sexo

No existen diferencias entre los valores séricos de TNF- α y el sexo de los pacientes con MG ($P=0,165$) (tabla 30).

	Hombres (n=12)	Mujeres (n=13)	<i>P</i>
TNF- α (pg/ml)	7,30 \pm 2,89	5,84 \pm 2,42	0,165

Tabla 30. Niveles de TNF- α en el grupo de pacientes distribuidos en función del sexo. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.2.4. TNF- α y forma clínica

Al clasificar a los sujetos en tres grupos: MG generalizada, MG ocular y controles, no encontramos diferencias significativas en los niveles de TNF- α ($P=0,907$) (tabla 31).

	MG generalizada	MG ocular	Controles	<i>P</i>
TNF- α (pg/ml)	6,70 \pm 2,46	6,45 \pm 2,91	6,22 \pm 2,65	0,907

Tabla 31. Niveles de TNF- α en el grupo de pacientes y controles. *P* evaluada con el test de Kruskal-Wallis.

La concentración de TNF- α era similar en pacientes con MG generalizada (6,70 \pm 2,46 pg/ml) en comparación con la de los controles (6,22 \pm 2,65, $P=0,591$).

No había diferencia entre los niveles séricos de los pacientes con MG ocular (6,45 \pm 2,91pg/ml) en comparación con los de los controles (6,22 \pm 2,65, $P=0,984$).

No existían diferencias al comparar niveles entre el grupo con MG ocular y MG generalizada ($P=0,799$).

	MG generalizada	MG ocular	<i>P</i>
TNF-α (pg/ml)	6,70 \pm 2,46	6,45 \pm 2,91	0,799

Tabla 32. Comparación de niveles séricos de TNF- α entre el grupo de pacientes con MG generalizada y pacientes con MG ocular. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.2.5. TNF- α y timo

Pacientes con anomalías tímicas presentaron valores en suero de TNF- α (7,04 \pm 5,42 pg/ml) no diferentes a los de los pacientes sin anomalías tímicas (6,50 \pm 2,57 pg/ml, $P=0,960$).

5.2.2.6. TNF- α y seropositividad

Los pacientes con anti-AChR positivos tenían niveles no significativamente diferentes (6,04 \pm 2,43 pg/ml) comparados con los de los pacientes seronegativos (8,54 \pm 3,11 pg/ml, $P=0,134$).

5.2.2.7. TNF- α y anti-AChR en suero

Existía una correlación positiva ($r=0,413$), aunque sin llegar a la significación estadística ($P=0,070$) entre los niveles de TNF- α en suero y los niveles séricos de anti-AChR en pacientes seropositivos.

5.2.2.8. TNF- α y otras condiciones autoinmunes

No existían diferencias entre los valores séricos de TNF- α y la presencia o no de enfermedades autoinmunes ($P=0,900$) (**tabla 33**).

	Autoinmunes (+) (n=3)	Autoinmunes (+) (n=22)	<i>P</i>
TNF- α (pg/ml)	6,78 \pm 3,86	6,51 \pm 2,63	0,900

Tabla 33. Niveles de TNF- α entre el grupo de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y pacientes sin otras enfermedades autoinmunes. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.2.9. TNF- α y autoanticuerpos nucleares en suero

Tampoco había diferencias en los niveles de TNF- α entre los pacientes con MG y anticuerpos nucleares (6,35 \pm 2,67 pg/ml) y los pacientes con MG sin anticuerpos nucleares (6,44 \pm 2,82 pg/ml) (**tabla 34**).

	AAN (+) (n=7)	AAN (-) (n=18)	<i>P</i>
TNF- α (pg/ml)	6,35 \pm 2,67	6,62 \pm 2,79	0,952

Tabla 34. Niveles de TNF- α entre el grupo de pacientes con anticuerpos antinucleares en suero o no. AAN: autoanticuerpos antinucleares. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.2.10. TNF- α y complemento

No existen relaciones entre los niveles de TNF- α y los niveles de C3, C4, C5 y C9. Se muestran los datos en la siguiente tabla (**tabla 35**).

	C3	C4	C5	C9
Coefficiente correlación (Rho de Spearman)	0,113	-0,027	0,197	-0,086
P	0.499	0,873	0327	0,608

Tabla 35. Correlaciones entre los niveles de TNF- α y componente séricos de complemento.

5.2.2.11. TNF- α y citocinas

No existían relaciones entre los niveles séricos de TNF- α y el resto de citocinas estudiadas (**tabla 36**).

	sCD40L	IFN-γ	IL-17
Coefficiente correlación (Rho de Spearman)	0,134	-0,049	0,062
P	0,422	0,763	0,703

Tabla 36. Correlaciones entre los niveles de TNF- α y otras citocinas estudiadas.

5.2.3. IL-17

5.2.3.1. IL-17 en pacientes y controles

Había una tendencia hacia niveles séricos de IL-17 incrementados en los pacientes con MG comparados con los controles, aunque no alcanzó la significación estadística (**tabla 37**).

	MG	Controles	<i>P</i>
IL-17 (pg/ml)	6,16 ± 7,48	3,2 ± 0,0	0,060

Tabla 37. Niveles de IL-17 en el grupo de pacientes y controles. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.3.2. IL-17 y edad de presentación

No había diferencias en los niveles de IL-17 entre la MG de debut precoz (10,64 ± 14,88 pg/ml) y la MG de debut tardío (5,17 ± 5,10pg/ml, *P*=0,633).

5.2.3.3. IL-17 y sexo

No existían diferencias entre los valores séricos de TNF- α y el sexo de los pacientes con MG (*P*=0,129) (**tabla 38**).

	Hombres (n=12)	Mujeres (n=13)	<i>P</i>
IL-17 (pg/ml)	3,49 ± 0,99	8,41 ± 9,67	0,129

Tabla 38. Niveles de IL-17 en el grupo de pacientes distribuidos en función del sexo. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.3.4. IL-17 y forma clínica

La concentración de IL-17 estaba elevada en los pacientes con MG generalizada ($10,7 \pm 10,9$ pg/ml) comparada con la concentración con los pacientes con MG ocular ($3,4 \pm 0,9$ pg/ml, $P=0,017$) y los controles sanos ($3,2 \pm 0,0$ pg/ml $P=0,013$).

Al clasificar a los sujetos en tres grupos: MG generalizada, MG ocular y controles, encontramos diferencias significativas en los niveles de IL-17 ($P=0,004$).

La concentración de IL-17 eran significativamente mayor en pacientes con MG generalizada ($10,7 \pm 10,9$ pg/ml) en comparación con la de los controles ($3,2 \pm 0,0$, $P=0,013$).

No había diferencia entre los niveles séricos de los pacientes con MG ocular en comparación con los controles (**tabla 39**).

	MG ocular	Controles	<i>P</i>
IL-17 (pg/ml)	$3,4 \pm 0,9$	$3,2 \pm 0,0$	0,386

Tabla 39. Comparación de niveles séricos de IL-17 entre el grupo de pacientes con MG ocular y controles. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

Existen diferencias al comparar niveles entre el grupo con MG ocular y MG generalizada ($P=0,017$).

	MG generalizada	MG ocular	<i>P</i>
IL-17 (pg/ml)	$10,7 \pm 10,9$	$3,4 \pm 0,9$	0,017

Tabla 40. Comparación de niveles séricos de IL-17 entre el grupo de pacientes con MG generalizada y pacientes con MG ocular. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.3.5. IL-17 y t mo

En la población entera, un significativo incremento en los niveles séricos de IL-17 fue observado en los pacientes con patología tímica ($28,6 \pm 6,2$ pg/ml): un paciente con timoma (35,1 pg/ml) y el otro paciente con hiperplasia tímica (27,1 pg/ml). Pacientes sin anormalidades tímicas tenían niveles más bajos de IL-17 ($4,1 \pm 2,5$ pg/ml, $P=0,001$).

5.2.3.6. IL-17 y seropositividad

Los pacientes con anti-AChR positivos tenían niveles no significativamente diferentes ($6,77 \pm 8,06$ pg/ml) comparados con los de los pacientes seronegativos ($3,20 \pm 0,00$ pg/ml, $P=0,224$).

5.2.3.7. IL-17 y anti-AChR en suero

La concentración de IL-17 en suero se correlacionaba con el título de anticuerpos anti-AChR. El coeficiente de correlación era de $r=0,242$ ($P=0,027$). Además, la concentración de anti-AChR por encima de la mediana (5,72 nmol/l) tenía niveles incrementados de IL-17 ($9,97 \pm 10,60$ pg/ml) comparados con aquellos con un título de anti-AChR por debajo de la mediana ($3,42 \pm 0,88$ pg/ml, $P=0,032$).

5.2.3.8. IL-17 y otras condiciones autoinmunes

Existían diferencias significativas entre los valores séricos de IL-17 y la presencia o no de enfermedades autoinmunes ($P=0,014$) (**tabla 41**).

	Autoinmunes (-) (n=22)	Autoinmunes (+) (n=3)	P
IL-17 (pg/ml)	4,12 ± 2,57	20,14 ± 15,30	0,014

Tabla 41. Niveles de IL-17 entre el grupo de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y pacientes sin otras enfermedades autoinmunes. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.3.9. IL-17 y autoanticuerpos nucleares en suero

Existía diferencia en los niveles de IL-17 entre los pacientes con MG y anticuerpos nucleares (11,48 ± 12,25 pg/ml) y los pacientes con MG sin anticuerpos nucleares (3,93 ± 2,38 pg/ml), aunque no llegaba a la significación estadística (*P*=0,057).

5.2.3.10. IL-17 y complemento

Existían relaciones entre los niveles de IL-17 y los niveles de C3, C5 y C9. La correlación entre IL-17 y C4 no llegaba a la significación estadística. Se muestran los datos en la siguiente tabla (**tabla 42**).

	C3	C4	C5	C9
Coefficiente correlación (Rho de Spearman)	-0,544	-0,274	-0,333	0,587
P	0,001	0,096	0,041	0,001

Tabla 42. Correlaciones entre los niveles de IL-17 y componente séricos de complemento.

5.2.3.11. IL-17 y citocinas

Existía una fuerte correlación positiva entre los niveles séricos de IFN- γ e IL-17 en los pacientes con MG ($r=0,838$; $P<0,001$) (**tabla 43**).

	sCD40L	IFN- γ	TNF- α
Coefficiente correlación (Rho de Spearman)	-0,363	0,838	0,062
P	0,023	0,001	0,703

Tabla 43. Correlaciones entre los niveles de IL-17 y otras citocinas estudiadas.

5.2.4. sCD40L

5.2.4.1. sCD40L en pacientes y controles

Los niveles séricos de CD40L estaban disminuidos en los pacientes con MG (8562 ± 3123 pg/ml) comparados con los de los controles (9526 ± 473 pg/ml), pero sin llegar a la significación estadística ($P=0,197$)

5.2.4.2. sCD40L y edad de presentación

No existían diferencias entre los valores séricos de sCD40L entre la presencia o no en suero de anti-AChR ($P=0,138$) (**tabla 44**).

	Debut precoz (n=4)	Debut tardío (n=21)	<i>P</i>
sCD40L (pg/ml)	6121 ± 4794	9027 ± 2615	0,138

Tabla 44. Niveles de sCD40L entre el grupo de pacientes con debut precoz (menores de 50 años) y el grupo de pacientes con debut tardío (mayores de 50 años). *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.4.3. sCD40L y sexo

No existen diferencias entre los valores séricos de sCD40L y el sexo de los pacientes AChR (*P*=0,885) (**tabla 45**).

	Hombres (n=12)	Mujeres (n=13)	<i>P</i>
sCD40L (pg/ml)	8336 ± 3347	8772 ± 3024	0,885

Tabla 45. Niveles de sCD40L entre el grupo de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y pacientes sin otras enfermedades autoinmunes. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.4.4. sCD40L y forma clínica

Al clasificar a los participantes en tres grupos: MG ocular, MG generalizada y controles no encontramos diferencias significativas entre los niveles séricos de sCD40L (*P*=0,477) (**tabla 46**).

	MG generalizada	MG ocular	Controles	<i>P</i>
sCD40L (pg/ml)	8855 ± 3269	8398 ± 3135	9526 ± 473	0,477

Tabla 46. Niveles de sCD40L en el grupo de pacientes y controles. *P* evaluada con el test de Kruskal-Wallis.

La concentración de sCD40L no era diferente entre pacientes con MG generalizada (8855 ± 3269pg/ml) en comparación con la de los controles (9526 ± 473, *P*=0,342).

No había diferencia entre los niveles séricos de los pacientes con MG ocular (8398 ± 3135pg/ml) en comparación con los controles (9526 ± 473, *P*=0,231).

No había diferencias entre la MG generalizada y MG ocular (*P*=0,880) (**tabla 47**).

	MG generalizada	MG ocular	<i>P</i>
sCD40L (pg/ml)	8855 ± 3269	8398 ± 3135	0,880

Tabla 47. Niveles de sCD40L en el grupo de pacientes y controles. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.4.5. sCD40L y timo

Interesantemente, encontramos niveles significativamente disminuidos (*P*=0,011) en pacientes con anomalía tímicas (4847 ± 6646 pg/mL) comparados con los de los pacientes sin alteraciones tímicas (8885 ± 2696 pg/mL).

5.2.4.6. sCD40L y seropositividad

Los niveles en pacientes seronegativos estaban incrementados (10000 ± 0 pg/mL) comparados con los pacientes seropositivos (8202 ± 3412 pg/mL) sin diferencias significativas ($P=0,174$).

5.2.4.7. sCD40L y anti-AChR en suero

No existía una correlación entre los niveles de sCD40L en suero y los anti-AChR ($r=0,178$; $P=0,454$).

5.2.4.8. sCD40L y otras condiciones autoinmunes

Existían diferencias significativas entre los valores séricos de sCD40L entre el grupo de pacientes con y sin otras condiciones autoinmunes ($P=0,001$) (**tabla 48**).

	Autoinmunes (+) (n=3)	Autoinmunes (-) (n=22)	<i>P</i>
sCD40L (pg/ml)	3650 ± 5137	9232 ± 2172	0,001

Tabla 48. Niveles de sCD40L entre el grupo de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y pacientes sin otras enfermedades autoinmunes. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.4.9. sCD40L y autoanticuerpos nucleares en suero

No existían diferencias entre los valores séricos de sCD40L entre la presencia o no en suero de anticuerpos antinucleares ($P=0,196$) (**tabla 49**).

	AAN (-) (n=18)	AAN (+) (n=7)	P
sCD40L (pg/ml)	8891 ± 2810	7719 ± 3935	0,196

Tabla 49. Niveles de sCD40L entre el grupo de pacientes con anticuerpos antinucleares y pacientes sin anticuerpos antinucleares en suero. AAN:anticuerpos antinucleares. P evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.4.10. sCD40L y complemento

No hay correlaciones entre el título de sCD40L con los niveles de C3, C4, C5 y C9. Se muestran los datos en la siguiente tabla (**tabla 50**).

	C3	C4	C5	C9
Coefficiente correlación (Rho de Spearman)	-0,062	0,129	-0,253	0,297
P	0,714	0,448	0,131	0,074

Tabla 50. Correlaciones entre los niveles de sCD40L y componente séricos de complemento.

5.2.4.11. sCD40L y citocinas

Encontramos una correlación positiva entre los niveles séricos de sCD40L e IL-17 ($r=0,363$; $P=0,023$) (**tabla 51**).

	IL-17	IFN- γ	TNF- α
Coefficiente correlación (Rho de Spearman)	-0,363	-0,287	0,134
P	0,023	0,080	0,422

Tabla 51. Correlaciones entre los niveles de sCD40L y otras citocinas estudiadas.

5.2.5. Interleucina-6

Los niveles de IL-6 en suero de pacientes con MG y en los pacientes controles no se detectan en ninguno de los sujetos estudiados. La sensibilidad es de 3,2 pg/mL.

5.2.6. Interleucina-10

Todos los pacientes, a excepción de uno, y sujetos controles tenían niveles séricos de IL-10 no detectables en sangre periférica.

El paciente con niveles de IL-10 de 42,72 pg/mL presentaba MG ocular. Tenía 79 años. El paciente es clasificado como seropositivo al presentar niveles séricos de anti-AChR de 5,76 nmol/l. No presenta enfermedades autoinmunes asociadas. Corresponde al caso n°.16 (**Anexo V**).

5.2.7. Complemento

5.2.7.1. Complemento en pacientes y controles

Los niveles séricos de C9 estaban incrementados en los pacientes con MG ($18,28 \pm 4,12$ pg/ml) comparado al grupo control ($15,75 \pm 1,83$ pg/ml; $P=0,035$). No había diferencias significativas en los niveles de C3 (MG, $34,76 \pm 8,84$ pg/ml; controles, $31,63 \pm 8,12$ pg/ml), C4 (MG, $33,95 \pm 7,07$ pg/ml; controles $36,23 \pm 7,43$ pg/ml) y C5 (MG, $11,51 \pm 3,19$ pg/ml; controles $12,28 \pm 3,88$ pg/ml) entre el grupo de pacientes y el grupo control (**tabla 52**).

	MG	Controles	P
C3 (pg/ml)	34,76 ± 8,84	31,63 ± 8,12	0,146
C4 (pg/ml)	33,95 ± 7,07	36,23 ± 7,43	0,198
C5 (pg/ml)	11,51 ± 3,19	12,28 ± 3,88	0,469
C9 (pg/ml)	18,28 ± 4,12	15,76 ± 1,83	0,035

Tabla 52. Niveles de C3, C4, C5 y C9 en el grupo de pacientes y controles. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.7.2. Complemento y edad de presentación

Existía una diferencia entre los niveles de C4 entre los pacientes con debut precoz y tardío, aunque no llegaban a la significación estadística ($P=0,081$). No había diferencias con el resto de componentes: C3, C5 y C9 (**tabla 53**)

	Debut precoz (n=4)	Debut tardío (n=21)	P
C3 (pg/ml)	30,30 ± 9,65	35,62 ± 8,66	0,317
C4 (pg/ml)	39,31 ± 5,80	32,9 ± 36,94	0,081
C5 (pg/ml)	9,98 ± 3,55	11,80 ± 3,12	0,313
C9 (pg/ml)	20,28 ± 5,90	17,90 ± 3,77	0,333

Tabla 53. Niveles de C3, C4, C5 y C9 entre el grupo de pacientes con debut precoz (menores de 50 años) y el grupo de pacientes con debut tardío (mayores de 50 años). *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.7.3. Complemento y sexo

Los niveles de C3 entre hombres y mujeres eran significativamente diferentes ($P=0,003$). No había diferencias con los niveles de C4, C5 y C9 entre hombres y mujeres. Los datos son mostrados en la tabla siguiente (**tabla 54**).

	Hombres (n=12)	Mujeres (n=13)	<i>P</i>
C3 (pg/ml)	39,98 ± 5,60	29,96 ± 8,67	0,003
C4 (pg/ml)	34,66 ± 7,27	33,29 ± 7,11	0,683
C5 (pg/ml)	11,53 ± 2,63	11,49 ± 3,74	0,913
C9 (pg/ml)	16,70 ± 2,51	19,74 ± 4,83	0,103

Tabla 54. Niveles de C3, C4, C5 y C9 en el grupo de pacientes distribuidos en función del sexo. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.7.4. Complemento y forma clínica

Al clasificar a los participantes en tres grupos: MG ocular, MG generalizada y controles, se encontraron diferencias significativas en los niveles de C9. No existían diferencias entre los niveles séricos de C3, C4 y C5 (**tabla 55**).

	MG generalizada	MG ocular	Controles	<i>P</i>
C3 (pg/ml)	29,85 ± 10,35	37,53 ± 6,72	31,63 ± 8,12	0,064
C4 (pg/ml)	31,36 ± 6,40	35,40 ± 7,20	36,23 ± 7,43	0,174
C5 (pg/ml)	11,17 ± 3,72	11,70 ± 2,96	12,28 ± 3,88	0,739
C9 (pg/ml)	21,06 ± 5,32	17,72 ± 2,19	15,76 ± 1,83	0,030

Tabla 55. Niveles de C3, C4, C5 y C9 en el grupo de pacientes y controles. *P* evaluada con el test de Kruskal-Wallis.

Existían diferencias significativas entre los niveles de C9 séricos ($P=0,021$) al comparar los pacientes con MG generalizada y los controles. No había diferencias con los otros componentes del complemento estudiados: C3, C4 y C5 (**tabla 56**).

	MG generalizada	Controles	<i>P</i>
C3 (pg/ml)	29,85 ± 10,35	31,63 ± 8,12	0,841
C4 (pg/ml)	31,36 ± 6,40	36,23 ± 7,43	0,057
C5 (pg/ml)	11,17 ± 3,72	12,28 ± 3,88	0,504
C9 (pg/ml)	21,06 ± 5,32	15,76 ± 1,83	0,021

Tabla 56. Comparación de niveles séricos de C3, C4, C5 y C9 entre el grupo de pacientes con MG generalizada y controles. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

Existían diferencias significativas entre los niveles de C3 al comparar a los pacientes con MG ocular y los controles (**tabla 57**). No había diferencia entre los niveles séricos de los componentes C4, C5 y C9 con MG ocular en comparación con los controles (**tabla 57**).

	MG ocular	Controles	<i>P</i>
C3 (pg/ml)	37,53 ± 6,72	31,63 ± 8,12	0,048
C4 (pg/ml)	35,40 ± 7,20	36,23 ± 7,43	0,417
C5 (pg/ml)	11,70 ± 2,96	12,28 ± 3,88	0,553
C9 (pg/ml)	17,72 ± 2,19	15,76 ± 1,83	0,136

Tabla 57. Comparación de niveles séricos de C3, C4, C5 y C9 entre el grupo de pacientes con MG ocular y controles. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

No había diferencias entre la MG generalizada y MG ocular al comparar los niveles séricos de C3, C4, C5 y C9 (**tabla 58**).

	MG generalizada	MG ocular	P
C3 (pg/ml)	29,85 ± 10,35	37,53 ± 6,72	0,054
C4 (pg/ml)	31,36 ± 6,40	35,40 ± 7,20	0,257
C5 (pg/ml)	11,17 ± 3,72	11,70 ± 2,96	0,733
C9 (pg/ml)	21,06 ± 5,32	17,72 ± 2,19	0,062

Tabla 58. Niveles de C3, C4, C5 y C9 en el grupo de pacientes y controles. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.7.5. Complemento y timo

Existían diferencias significativas en los niveles de C9 en los pacientes con y sin alteraciones tímicas ($P=0,021$). Existían diferencias, aunque no llegaba a la significación estadística, en los niveles de C3 ($P=0,057$) y C5 ($P=0,071$). No había diferencias en los niveles de C4 ($P=0,270$) entre los pacientes con y sin alteraciones tímicas

	Timo (+) (n=2)	Timo (-) (n=23)	P
C3 (pg/ml)	21,58±0,60	35,91±8,24	0,057
C4 (pg/ml)	26,73±10,27	34,58±6,68	0,270
C5 (pg/ml)	7,50±0,00	11,86±3,08	0,071
C9 (pg/ml)	27,83±1,66	17,45±3,06	0,021

Tabla 59. Niveles de C3, C4, C5 y C9 entre el grupo de pacientes con alteraciones en el timo y el grupo de pacientes con timo normal. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.7.6. Complemento y seropositividad

Existían diferencias, aunque sin llegar a la significación estadística, en los niveles de C9 entre los pacientes seropositivos y seronegativos. No había diferencias en los niveles de C3, C4 y C5. Los datos son mostrados en la **tabla 60**.

	Seropositivos (n=20)	Seronegativos (n=5)	<i>P</i>
C3 (pg/ml)	33,29 ± 9,12	40,67 ± 4,38	0,135
C4 (pg/ml)	33,55 ± 7,43	35,54 ± 5,83	0,455
C5 (pg/ml)	11,43 ± 3,22	11,83 ± 3,39	1,000
C9 (pg/ml)	18,90 ± 4,23	15,80 ± 2,67	0,072

Tabla 60. Niveles de C3, C4, C5 y C9 entre el grupo de pacientes seropositivos y seronegativos. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.7.7. Complemento y anti-AChR en suero

No había correlaciones entre el título de anti-AChR en suero y los componentes del complemento: C3, C4, C5 y C9. Los datos son mostrados en la siguiente tabla (**tabla 61**).

	C3	C4	C5	C9
Coefficiente correlación (Rho de Spearman)	-0,292	-0,186	0,362	-0,037
<i>P</i>	0,212	0,433	0,116	0,877

Tabla 61. Correlaciones entre los niveles de anti-AChR y componentes séricos de complemento.

5.2.7.8. Complemento y otras condiciones autoinmunes

Había diferencias significativas en los niveles de C9 y la presencia o no de otras condiciones autoinmunes en la cohorte de pacientes con MG. Existía una tendencia, aunque no significativa, al comparar los niveles de C3 C4 y C5 (**tabla 62**).

	Otras condiciones autoinmunes (n=3)	Sin otras condiciones autoinmunes (n=22)	<i>P</i>
C3 (pg/ml)	26,22 ± 8,05	35,93 ± 8,44	0,094
C4 (pg/ml)	27,15 ± 7,31	34,87 ± 6,68	0,132
C5 (pg/ml)	8,00 ± 0,87	11,99 ± 3,09	0,054
C9 (pg/ml)	25,02 ± 5,00	17,36 ± 3,10	0,024

Tabla 62. Niveles de C3, C4, C5 y C9 en los pacientes con MG distribuidos en función de la existencia o no de otras enfermedades autoinmunes. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.7.9. Complemento y autoanticuerpos nucleares en suero

No había diferencias significativas entre los niveles séricos de los componentes del complemento C3, C4, C5 y C9 entre los pacientes con o sin autoanticuerpos nucleares en suero. Los datos son mostrados en la siguiente tabla (tabla 63).

	AAN (-) (n=18)	AAN (+) (n=7)	P
C3 (pg/ml)	36,13 ± 8,11	31,26 ± 10,28	0,333
C4 (pg/ml)	35,01 ± 7,07	31,21 ± 6,80	0,364
C5 (pg/ml)	12,00 ± 2,99	10,25 ± 3,58	0,214
C9 (pg/ml)	17,12 ± 2,82	21,28 ± 5,55	0,102

Tabla 63. Niveles de C3, C4, C5 y C9 entre el grupo de pacientes con anticuerpos antinucleares y pacientes sin anticuerpos antinucleares en suero. AAN:anticuerpos antinucleares. *P* evaluada con el test de Mann-Whitney.

5.2.7.10. Correlaciones entre componentes de complemento

Existía una correlación negativa entre los niveles séricos de C3 y C9 ($r=-0,364$, $P=0,025$). Existía una correlación positiva entre los niveles de C5 y C3 ($0,333$, $P=0,041$). Los datos detallados son mostrados en la **tabla 64**.

	C3	C4	C9	C5
C3	1	0,095; $P=0,570$	-0,364*; $P=0,025$	0,333*; $P=0,041$
C4	0,095; $P=0,570$	1	-0,202; $P=0,224$	0,206; $P=0,215$
C9	-0,364*; $P=0,025$	-0,202; $P=0,224$	1	-0,189; $P=0,256$
C5	0,333*; $P=0,041$	0,206; $P=0,215$	-0,189; $P=0,256$	1

Tabla 64. Correlaciones entre los niveles de sCD40L y componente séricos de complemento. * Nivel de significación $<0,05$.

5.2.7.11. Correlaciones en controles

Se han realizado análisis de correlaciones entre las diferentes citocinas sin encontrar significación en las mismas (datos no mostrados).

6. DISCUSIÓN

6.1. Sección I: epidemiología

6.1.1. Incidencia

Una revisión reciente informaba que la incidencia de la MG era de 0,9 a 2,1 por cada 100.000 habitantes y año ([Meyer and Levy, 2010](#)). La incidencia encontrada en nuestro estudio es ligeramente superior: 3,25 por 100.000 habitantes y año. Esta cifra incrementada en nuestro trabajo es a expensas de pacientes con diagnóstico tardío (después de los 50 años), especialmente en pacientes mayores de 70 años. En este grupo de edad la incidencia encontrada era de 8,81 por 100.000 habitantes y año.

Nuestros hallazgos apoyan informes previos donde se sugiere que el incremento de la incidencia de la enfermedad se centra fundamentalmente en el subgrupo de población anciana. Estos trabajos apuntan que la incidencia real en población anciana podría ser incluso superior a la publicada debido a errores diagnósticos ([McGrogan, Sneddon and de Vries, 2010](#)).

Entre 1960 y 1980 la incidencia de MG variaba entre 0,3 y 0,9 por 100.000 habitantes y año. Posteriormente la incidencia informada es de 2,12 por 100.000 habitantes y año. Además, se estima que la incidencia de MG está subestimada y muchos expertos sugieren que la cifra más exacta de incidencia se ajustaría al límite de confianza superior de las tasas informadas, en torno a 3 nuevos casos por 100.000 habitantes y año ([McGrogan, Sneddon and de Vries, 2010](#)). Nuestros datos apoyan la afirmación previa. En este sentido, al tratarse de un estudio prospectivo, se ha disminuido la pérdida de casos diagnosticados al no haber un registro centralizado obligatorio.

El incremento de la incidencia aún no está aclarado. La mayor parte de los trabajos señalan que el incremento en el número de casos de MG se debe a una conciencia

mayor de esta condición en la población anciana, a un incremento de la incidencia real en la población mayor o más probablemente a ambas hipótesis.

Así, el incremento de la incidencia en un periodo tan corto de tiempo en la población mayor a 50 años habría que atribuirlo a factores ambientales o externos. La posibilidad de un efecto de cohorte no es muy sostenible considerando que hay diferentes trabajos en regiones y países alejados. Por tanto el envejecimiento del sistema inmune asociado a desencadenantes externos como tumores, infecciones y agentes químicos se erige como la alternativa más plausible para explicar el incremento en la incidencia. La presencia aumentada de autoanticuerpos antimúsculo estriado en la población anciana apoyaría esta tesis, aunque los mecanismos exactos distan mucho de estar respondidos.

Por otra parte, el envejecimiento de la población u otras características demográficas tampoco explicaría el incremento de la incidencia como consecuencia de los ajustes en las tasas de incidencia de los diferentes trabajos.

Como consecuencia del seguimiento centralizado de la MG en nuestro medio, los casos perdidos no suponen una fuente de error metodológico.

Es tentador, considerando el relativo pequeño periodo de estudio (24 meses), atribuir nuestras altas tasas de incidencia a factores extrínsecos desconocidos, a los caprichos de la estadística o a una atipicidad de la muestra. Sin embargo, teniendo en mente la abrumadora y creciente evidencia del incremento en la incidencia de MG, nuestro trabajo debiera considerarse como un dato ajustado a la realidad actual.

Por último, un estudio realizado en Cataluña hace más de 10 años informaba cifras superiores a 2 nuevos pacientes con MG por cada 100.000 habitantes y año ([Aragonès et al., 2003](#)). Dada la cercanía geográfica con la población de dicho estudio, habría que

considerar la posibilidad de que nuestro territorio formase parte de una región geoepidemiológica favorable al desarrollo de MG.

6.1.2. Edad de presentación

Como se muestra en el **gráfico 3**, se observan dos picos en la edad de presentación de la MG. El primero de ellos, de menor tamaño, presentaba una ligera preferencia hacia el sexo femenino apareciendo entre los 20 y 40 años. El segundo de ellos, mucho mayor, presentaba una predisposición hacia el sexo masculino que ocurría entre los 60 y 80 años. Este comportamiento bimodal es de largo tiempo conocido.

La incidencia de MG en 1970 era similar al comparar MG de debut precoz y tardío ([Somnier, 2005](#)). Desde entonces la incidencia de MG de debut precoz ha permanecido estable en torno a cifras de 2 a 4 por millón de habitantes y año. Sin embargo la incidencia de MG de debut tardío alcanzó en el año 2000 entre 20 y 22 pacientes por millón de habitantes y año.

La mayoría de los trabajos que aportan datos sobre las características epidemiológicas de pacientes con MG son cohortes prevalentes. Las cohortes prevalentes difieren en muchas características de las cohortes incidentes ([Huisman et al., 2011](#)).

6.1.3. Sexo

En pacientes con MG de inicio precoz la ratio mujer:hombre es de 3:1. Nuestra razón 2:1 no es significativamente diferente a los trabajos publicados. En cambio, en la MG de inicio tardío la relación se invierte ligeramente a favor de los varones. Nuestro

trabajo muestra una predisposición de hasta casi el doble, 15:9, a favor de los varones. Estos datos son comparables a trabajos previos ([Meriggioli and Sanders, 2009](#)).

6.1.4. Gravedad de los síntomas

Nuestro trabajo apoya anteriores resultados que indican que la forma más frecuente de presentación es la ocular, hasta en un 80% de los pacientes ([Grob et al., 2008](#)). Nuestra proporción era relativamente algo menor (66%).

Sin embargo, muchos de los pacientes clasificados como MG generalizada presentaron síntomas oculares previos al desarrollo de síntomas más generales con afectación de musculatura respiratoria, bulbar o de extremidades.

La mayoría de los trabajos se refieren a los síntomas de inicio pero no a la forma clínica de la enfermedad en el momento del diagnóstico. En nuestro trabajo, la forma de presentación era definida como aquella clínica que existía en el momento del diagnóstico. En concreto, en nuestro trabajo dos pacientes con MG generalizada, al hacer una historia retrospectiva habían consultado y habían sido diagnosticados de oftalmoplejía internuclear de etiología no filiada (**Anexo V. Caso nº.3 y nº.18**). A los meses, desarrollaron síntomas generalizados conduciendo al diagnóstico de MG. Así la cifra de síntomas oculares al inicio correspondería a un 72%.

En los dos años desde el inicio de la enfermedad, los síntomas oculares (diplopía o ptosis) progresan en la mayoría de los casos (en torno al 85% de los pacientes), quedándose un pequeño porcentaje del 15% con MG ocular. Esta es la razón por la que nuestros pacientes eran mayoritariamente oculares, ya que eran formas de reciente diagnóstico.

Series previas informan diferentes proporciones con 17% para clase 0 y I de la MGFA, 74% para la clase II, 9% para clases III, IV y V (Aguilar et al., 2010). Estos datos eran retrospectivos con cohortes prevalentes por lo que no pueden ser comparados con nuestros datos. No hay trabajos similares a los nuestros. Nuestros porcentajes eran de 66% para formas oculares, 17% para clase II y 17% para clase III o mayores en el momento del diagnóstico, que parece más razonable al tratarse de una cohorte incidente.

6.1.5. Seropositividad

La relación del título de anti-AChR con la gravedad de la enfermedad es un tema controvertido que continúa hasta la actualidad sin obtener una respuesta satisfactoria y uniforme.

Existen muchos informes con datos contradictorios sobre la relación entre el título de autoanticuerpos anti-AChR y la gravedad de la enfermedad (Aurangzeb et al., 2009; Keeseey et al., 1982). Sin embargo, en líneas generales se acepta que el título de anticuerpos en pacientes con MG generalizada es mayor en comparación con el grupo de pacientes con MG ocular.

Nuestros datos apoyan esta última tesis puesto que encontramos valores significativamente diferentes a pesar del pequeño tamaño de la muestra.

Por otra parte, existen evidencias de que el nivel de autoanticuerpos se relaciona con la gravedad en un paciente individualmente (Newsom-Davis et al., 1978). Es decir que la monitorización de los auto anti-AChR se relaciona con la gravedad clínica.

Por otra parte, Farrugia y col. mostraron la relación entre el título de autoanticuerpos anti-AChR y la afectación muscular en la electromiografía de fibra aislada (Farrugia et al., 2009).

Como era de esperar, no encontramos relaciones del título de anti-AChR en relación a la edad de debut o sexo. Sin embargo, sí existían diferencias que rozaban la significación estadística entre los pacientes con autoanticuerpos frente antígenos nucleares (p. ej., ANA, AMA, ASMA) en comparación con aquellos pacientes sin estos autoanticuerpos, sugiriendo la existencia de un sustrato inmunológico común en este subgrupo de pacientes.

6.1.6. Seropositividad anti-MuSK

Se estima una incidencia anual de 0,10 pacientes con anti-MuSK por 100.000 habitantes (Niks, Kuks and Verschuuren, 2007). Estas cifras podrían ser superiores en países mediterráneos. La presencia de anti-MuSK en pacientes seronegativos con MG generalizada varía del 0% en países con latitudes altas como Noruega, 25% en latitudes medias como Dinamarca, Reino Unido, Alemania, Holanda y llegando al 40% en países mediterráneos. En países orientales se informan cifras entre el 3 y 25% de positividad anti-MuSK (Zhang et al., 2007).

En nuestra cohorte, hubiésemos esperado haber encontrado un paciente durante el periodo de estudio. Sin embargo, nuestra cohorte tenía sólo 2 pacientes con MG generalizada con autoanticuerpos anti-AChR negativos. Dado que la frecuencia de anti-MuSK en pacientes seronegativos en nuestro medio está en torno al 40%, puede considerarse un hallazgo no significativo.

6.1.7. Patología tímica

En nuestro trabajo, la prevalencia de timoma era relativamente baja (1 de 29 pacientes: 3%). Estos datos contrastan con otros estudios donde informan hasta un 10% de timomas entre los pacientes con MG. Sin embargo, hay también varios estudios donde muestran porcentajes similares a los nuestros, en torno al 3%, con 153 pacientes estudiados con MG (Cunha, Scolea and Werneck, 1999). Un estudio donde reclutaban pacientes con MG ocular de diagnóstico reciente mostró un porcentaje incluso inferior al nuestro con 1 de 147 pacientes (0,7%), con timoma (Kupersmith, Laskany and Homel, 2003).

No obstante, nuestros datos deberían también tomarse con cautela debido al pequeño tamaño de la muestra. Además, la presencia de timomas es más frecuentemente asociado a edades más precoces que la media muestral de nuestro trabajo, siendo poco frecuente la aparición en pacientes mayores de 60 años.

6.1.8. Neoplasias asociadas

La MG podría considerarse un síndrome paraneoplásico en relación a un timoma. Otros síndromes miasténicos con anomalías en la unión neuromuscular (síndrome de Eaton-Lambert) son considerados como síndromes paraneoplásicos hasta en el 50% de los casos con tumores en diferentes órganos y sistemas asociados (el más frecuentemente asociado es el tumor de células pequeñas de pulmón).

En cambio, en la MG, ningún otro tumor o neoplasia, además del timoma, ha sido relacionado claramente con MG. Existe una excepción, los linfomas. La MG puede ocurrir de forma simultánea o no con la aparición de un linfoma (Rezani et al., 2011).

En ocasiones la MG puede aparecer tiempo después de haber padecido un linfoma. Las causas pueden ser secundarias a los tratamientos empleados o ser debido a una afectación intrínseca de los propios linfocitos que conducen a la pérdida de los mecanismos de autorregulación inmune permitiendo la aparición de la MG.

Por otra parte, diferentes enfermedades autoinmunes, incluida la MG, podrían facilitar el desarrollo de linfomas ([Gabrielli et al., 1998](#)) mediante mecanismos no aclarados.

El paciente con Linfoma no Hodgkin descrito en nuestra serie no había recibido tratamiento para el proceso linfoproliferativo, por lo que se puede desechar la etiología iatrogénica. Tampoco ha habido cambios clínicos o radiológicos del proceso tumoral desde el comienzo de la enfermedad autoinmune.

En conclusión, todos los informes apuntan a una relación causal más que casual entre los procesos linfoproliferativos y la MG. Sin embargo, los mecanismos que determinan esta relación están lejos de verse aclarados.

6.1.9. Otras enfermedades autoinmunes

Es un hecho conocido desde hace tiempo que los pacientes con MG, como enfermedad autoinmune, tienen un riesgo incrementado de padecer otras condiciones autoinmunes. La asociación con otras enfermedades autoinmunes oscila entre el 5 y el 15% según las series. Las más frecuentes son la tiroiditis autoinmune, la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico ([Mao et al., 2011](#)). Otras enfermedades que pueden asociarse son la alopecia areata, miositis, miocarditis o anemia perniciosa.

El riesgo de presentar otras enfermedades autoinmunes es mayor en el caso de mujeres con MG generalizada y debut precoz. Nuestros datos apoyan estos resultados, aunque

con porcentajes ligeramente inferiores, probablemente debido a que nuestra cohorte de pacientes tenía una edad media más alta con gran proporción de pacientes con MG ocular.

Cuatro pacientes con MG en nuestra serie tenían otras enfermedades autoinmunes: tiroiditis autoinmune, artritis reumatoides, lupus y anemia perniciosa. Tres de ellos presentaban MG generalizada, y dos pertenecían al grupo de MG de inicio precoz, lo que suponía un porcentaje relativamente elevado en este subgrupo de pacientes. Todos los pacientes eran seropositivos.

Diferentes estudios han descrito la coexistencia de MG y lupus eritematoso sistémico (LES). Aunque las dos son enfermedades autoinmunes, varios aspectos las diferencian: por un lado, la MG está producida generalmente por la presencia de un solo autoanticuerpo patogénico, anti-AChR (aunque también en estos pacientes pueden existir autoanticuerpos contra antígenos musculares) mientras que en el LES existen varios autoanticuerpos dirigidos fundamentalmente contra antígenos nucleares. Por otra parte, la MG es una enfermedad autoinmune órgano-específica (la unión neuromuscular), mientras que el LES afecta a diferentes órganos y sistemas.

Hay diferentes estudios donde se muestran casos de MG que aparece en pacientes ya diagnosticados de LES, y otros muchos a la inversa. Existen evidencias que el LES podría desencadenarse en pacientes con MG sometidos a timectomía.

Cohortes de pacientes con MG demuestran alta incidencia de títulos elevados de autoanticuerpos relacionados con el LES: ANA en 38,5%, anti-ds-DNA en 19,2%. En estos estudios demuestran una relativamente alta incidencia de LES, 7,7% ([Stoeger et al., 2006](#)). El riesgo era mayor en pacientes mujeres con MG con debut precoz y sintomatología generalizada. En la mayoría de los casos la MG precedió al diagnóstico

de LES. En este subgrupo de pacientes, suponía un 23% de los pacientes (mujeres, debut precoz, MG generalizada).

Nuestro caso entre los 29 pacientes supone un 3%, pero considerando que sólo teníamos 6 pacientes con debut precoz, el porcentaje asciende al 16%, cifra comparable en cierto modo con el estudio de Stoeber et al.

En conclusión, como previos informes apuntan, y el nuestro apoya, debería realizarse un despistaje de signos y síntomas de LES (contaje hematológico, autoanticuerpos: dsDNA, ANA, función renal, sintomatología articular y de serosas, inspección cutánea entre otros) en todo paciente con MG, especialmente si hay debut precoz, la enfermedad es generalizada y el paciente es de sexo femenino.

6.1.10. Aperistalsis esofágica

La disfagia es un síntoma frecuente en los pacientes con MG ([McIntyre, McVaugh-Smock and Mourad, 2004](#)). Habitualmente, viene acompañado con otros síntomas bulbares, como voz nasal o disnea, u oculares. Lo que no es muy usual es la presentación aislada como único síntoma, apareciendo tan sólo en un 6% de los pacientes con esta enfermedad ([González, Chaves and Copello, 2010](#); [Cook, 2009](#)). En el estudio de Huang et al. ([Huang, King and Chien, 2010](#)) se demostraba que el 96% de los pacientes con MG y disfagia presentaban alteraciones en la manometría esofágica, afectando tanto a la musculatura estriada como, sorprendentemente, a la lisa. El tercio medio e inferior del esófago está formado por musculatura lisa, mientras que el esfínter esofágico superior es musculatura voluntaria. En el tercio superior se produce la transición de musculatura estriada a lisa. Una explicación, para estos hallazgos en la musculatura lisa, sería que como consecuencia de la afectación primaria de la

musculatura voluntaria del esófago, se produciría una disminución del *feedback* aferente de la porción más distal esofágica. Otra hipótesis es que se produjese un bloqueo de transmisión entre las neuronas del nervio dorsal del vago y las neuronas del plexo mientérico esofágico. Esta transmisión está mediada por canales nicotínicos de ACh, pero de tipo gangliónico, diferentes de los receptores de ACh, también nicotínicos, de la placa motora (Vernino, Hopkins and Wang, 2009). La reactividad cruzada entre estos dos tipos de receptores es poco conocida (Vernino, Cheshire and Lennon, 2001). En el trabajo de Llabrés et al. (Llabrés, Molina-Martínez and Miralles, 2005) en el que se presentaba a 2 pacientes con disfagia como síntoma aislado, en los que se había realizado estudio manométrico, encontró también datos de afectación de musculatura lisa con contracciones peristálticas de baja amplitud, pero no tan graves como en nuestro paciente, en el que demostramos aperistalsis. En el aperistaltismo esofágico, es importante considerar el diagnóstico de acalasia, que cursa además con aumento de tono del esfínter esofágico inferior o ausencia de la relajación de éste con la deglución. En nuestro paciente, el tono del EEI estaba levemente disminuido y la relajación era correcta. Lo realmente sorprendente del caso es que en la manometría no se evidenciaba una llamativa patología de musculatura estriada a nivel faríngeo, pero sí de grave afectación de la musculatura lisa. Este resultado podría parecer, en principio, paradójico (Ertekin, Yüceyar and Aydogdu, 1998). Posiblemente, el número de degluciones en el estudio manométrico, ocho, no fueran suficientes para desencadenar fatigabilidad de la musculatura estriada.

Los hallazgos en el estudio manométrico pueden ayudar al diagnóstico y podrían ser una herramienta útil en el diagnóstico de MG, especialmente en los casos donde la respuesta a los anticolinesterásicos es dudosa (Ferreira et al., 2007).

6.2. Sección II: inmunología

6.2.1. IFN- γ

Informes previos señalan la importancia de las citocinas Th1-dependientes (con el IFN- γ como mediador más representativo) frente a las citocinas Th2-dependientes en el desarrollo de la MG autoinmune experimental (Balasa et al., 1997).

Así, las células Th1 y sus citocinas son requeridas para la generación de una respuesta inmune humoral patogénica anti-AChR (Conti-Fine, Milani and Kaminski, 2006; Shandley, Martínez and Krolick, 2009). IFN- γ podría influir en el debut de la enfermedad y en la progresión de la misma (Balasa et al., 1997). Sin embargo, la función y relevancia de esta citocina no está del todo aclarada en humanos.

En nuestro estudio, encontramos niveles incrementados de IFN- γ en pacientes con MG, especialmente en aquellos con MG generalizada, en comparación con controles sanos. Este hallazgo sugeriría no sólo la implicación patogénica de esta citocina en la enfermedad, sino también su relevancia como marcador de gravedad.

Por otra parte, tratamientos en la MG autoinmune experimental (EAMG) con células dendríticas moduladas con IFN- γ atenúan los síntomas en ratas de experimentación mediante la disminución en la expresión de BAFF y disminuyendo el número de células productoras de autoanti-AChR (Adikari et al., 2004).

De esta forma, antagonistas contra IFN- γ podrían ser nuevas dianas terapéuticas efectivas en MG en humanos y abren una nueva vía de exploración para los próximos años.

En nuestra serie, sólo dos pacientes presentaban alteraciones tímicas. Sin embargo, los niveles de IFN- γ en este pequeño grupo eran significativamente mayores, reservando un papel especial de este mediador en este subgrupo de pacientes.

A pesar de que nuestra cohorte presentaba síntomas leves de la enfermedad, con 16 de los 25 pacientes con MG ocular, los niveles de IFN- γ seguían estando elevados. Los pacientes con MG generalizada aún presentaban niveles mayores de IFN- γ . Juntando todo esto, sugerimos que la monitorización de esta citocina podría ser un marcador de riesgo para el desarrollo de la forma generalizada en los pacientes con MG ocular de reciente diagnóstico. Futuros estudios deberían aclarar esta cuestión teniendo en cuenta la ausencia hasta la fecha de marcadores de progresión.

Por último es importante señalar la fuerte correlación entre los niveles de IFN- γ e IL-17, ambas citocinas pro-inflamatorias, señalando su implicación en el inicio de la enfermedad autoinmune.

6.2.2. TNF- α

TNF- α es una citocina pro-inflamatoria producida fundamentalmente por el linaje monocito-macrófago. Diferentes agentes que bloquean la función de este mediador, como etanercept o infliximab, han demostrado la eficacia clínica cuando son empleados en pacientes con MG.

En una serie de casos con 11 pacientes con MG, hubo una mejoría en 6 de ellos al emplear etanercept. En dos pacientes hubo un empeoramiento clínico. La gravedad clínica no se relacionaba con los niveles séricos de TNF- α previo al tratamiento ni con los niveles séricos de anti-AChR (Rowin, 2008; Rowin et al., 2004). Los determinaciones eran medidas a los 2 y 6 meses postratamiento.

Otro trabajo también mostraba beneficio clínico en pacientes con MG tratados con etanercept. En estos pacientes tampoco existía una relación entre los niveles séricos de

TNF- α con los anti-AChR (Tüzün, Meriglioli and Rowin, 2005). Esto indica que la acción de etanercept no era mediada por la inhibición del título de autoanticuerpos.

En otras enfermedades autoinmunes se ha sugerido que el tratamiento con etanercept puede producir un incremento sérico de los niveles de TNF- α , como consecuencia de un mecanismo compensatorio (Zou et al., 2003). Esto podría explicar los informes de casos de pacientes que desarrollaron síntomas miasténicos con elevación de anti-AChR tras la administración de etanercept para tratar otras enfermedades como artritis reumatoide y psoriásica o el empeoramiento clínico en algunos pacientes con MG tratados con etanercept. Los síntomas en estos pacientes mejoraban con la suspensión de etanercept.

Un trabajo reciente no mostraba relación entre el status clínico con los niveles séricos de TNF- α en 33 pacientes con MG (Lee, Joo and Seok, 2009). Apoyando este informe, nuestros datos no mostraron diferencias significativas entre los pacientes con MG y controles. Además, completa las conclusiones de Lee et al. debido a que nuestros pacientes eran tratados exclusivamente con inhibidores de la colinesterasa sin interferencia de inmunomoduladores en los resultados.

No encontramos ninguna utilidad clínica en la determinación de los niveles séricos de pacientes con MG de reciente diagnóstico.

6.2.3. IL-17

El papel de IL-17 no ha sido estudiado en pacientes con MG. Mu et al. demostraron que en la MG autoinmune experimental, el modelo animal de MG, la proporción alterada en las células Th17 era la más importante entre el desequilibrio de las subpoblaciones de las células T helper: Th1, Th2, Treg y Th17, con los niveles de IL-17 up-regulados (Mu et al., 2009). Es decir, la proporción de células Th17 era la que más notablemente cambiaba con la progresión y evolución de la enfermedad.

En nuestro estudio, encontramos que los niveles séricos de IL-17 estaban incrementados en pacientes con MG generalizada comparados con los niveles encontrados en los controles o en los pacientes con MG ocular. Esto sugiere un importante papel para esta citocina en la patogénesis de MG.

La IL-6 es una citocina que estimula a las células Th17, células productoras de IL-17. Sin embargo, no encontramos niveles incrementados de IL-6 (Kimura and Kishimoto, 2010; El-Behi et al., 2010). Como primera posibilidad sugerimos que, a pesar de que IL-6 es imprescindible en la regulación de las células Th17, se requieren otros mediadores hasta la fecha desconocidos.

La producción de anticuerpos está regulada por las células T helper. IL-17 sola o en combinación con el factor de activación de células B (BAFF) controla la supervivencia y proliferación de las células B y su diferenciación en células secretoras de inmunoglobulinas (Doreau et al., 2010). Nuestros datos son consistentes con previos informes que demuestran niveles incrementados de BAFF en pacientes con MG comparados con los de controles sanos (Ragheb, Bealmear and Lisak, 2009; Kim et al., 2008). Sin embargo, los niveles de BAFF sólo se correlacionan pobremente con la actividad de la enfermedad (El-Behi et al., 2010). Ya que en nuestro estudio demostramos que IL-17 se correlaciona con la gravedad de la enfermedad, esto sugiere un papel más importante de IL-17 comparado con el factor BAFF en la activación de las células B para producir autoanticuerpos. Sin embargo, no investigamos en nuestro estudio los niveles de BAFF, por lo esta hipótesis debería ser comprobada en futuras investigación.

6.2.4. sCD40L

Hasta la fecha no hay estudios que informen sobre la relación entre la MG y los niveles de sCD40L en suero, a pesar de que existe una creciente evidencia en considerarlo como un nuevo marcador inflamatorio en otras enfermedades y pruebas sólidas sobre la implicación de este mediador en animales con MG.

CD40 ligando (CD40L) es una proteína transmembrana que puede escindirse constituyendo el componente sCD40L. CD40L es expresada preferentemente en las células T helper activadas. Cuando se une a su receptor (CD40) es capaz de desencadenar la expresión de varios mediadores inflamatorios como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ , además de producir una activación y expansión clonal de las células T antígeno-específicas.

Junto con las vías clásicas de señalización de activación de las células T (TCR/MHC y CD28-B7), la interacción CD40-CD40L es requerida para la completa activación de los linfocitos T. En animales con EAMG se requiere la interacción CD40-CD40L para la inducción de la enfermedad: ratones CD40^{-/-} son completamente resistentes al desarrollo de MG (Shi et al., 1998) y el bloqueo CD40L suprime la enfermedad, a través de la inhibición de la diferenciación de las células Th1.

En este trabajo hemos demostrado niveles significativamente disminuidos de sCD40L en pacientes con alteraciones tímicas y en aquellos pacientes en los que coexistían otras enfermedades autoinmunes. También demostramos una tendencia hacia niveles disminuidos en pacientes con MG comparados con los de los controles. Sugerimos una implicación de CD40L en la patogénesis de la enfermedad, que implicaría un consumo de sCD40L en los pacientes afectados.

En cambio, existía una correlación negativa entre el título de IL-17 e IFN- γ y los niveles de sCD40L. Este hallazgo puede explicarse considerando que el bloqueo de sCD40L produce en animales una inhibición de las células Th1 y como consecuencia una disminución de su citocina más representativa, IFN- γ .

6.2.5. IL-6

Es una citocina Th2-dependiente. Los niveles no diferían en los pacientes con MG. Dos explicaciones podrían derivarse de este hallazgo: 1) la vía Th2 no predomina en la patogénesis de la MG, ó 2) IL-6 no es un mediador determinante en la inducción y desarrollo de la enfermedad.

Hay que destacar que las mediciones de todas las citocinas fueron realizadas empleando un inmunoensayo basado en rayos multiplexados fluorescentes (tecnología Multiplex). Es considerada una herramienta excelente para este fin. No encontramos niveles medibles de IL-6 ni de IL-10, con una alta sensibilidad de 3,2 pg/ml.

Estos datos son compatibles con los observados en un informe reciente ([Baggi et al., 2008](#)), donde los niveles séricos de esta citocina en 6 pacientes con MG estaban por debajo de 2,0 pg/ml (por tecnología ELISA). Por tanto, ambos informes considerados juntamente proporcionan suficiente evidencia para sugerir que IL-6 no juega un papel fundamental en la patogénesis de MG.

6.2.6. IL-10

La citocina IL-10 presenta funciones diversas. Por una parte es uno de los principales estimuladores de las células B promoviendo tanto la proliferación como la

diferenciación de las mismas. Por otra parte es capaz de inhibir la actividad de las células Th1.

De hecho, hemos demostrado que la vía Th1 está potenciada en esta enfermedad, *medida con los valores de IFN- γ* . Pero por otra parte diferentes factores estimuladores de las células B, *valorado con los niveles de IL-17*, también están incrementados en suero de pacientes.

Ambas funciones, a priori *contrapuestas*, podrían explicar nuestro hallazgo de la no presencia en suero de niveles significativamente diferentes (aumentados o disminuidos) entre pacientes y controles ni diferencias o relaciones con determinadas características de la enfermedad.

Yeh et al., sugirieron que los niveles de IL-10 están incrementados en pacientes con MG (Yeh et al., 2009). Nosotros no conseguimos replicar estos resultados probablemente debido a diferencias en las características basales de nuestra muestra ya que ninguno de nuestros pacientes estaban en tratamiento con corticoesteroides o fármacos inmunosupresores.

6.2.7. Complemento

El daño en la membrana muscular y la degradación acelerada de los AChR provocada por la activación del complemento y la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) es considerado la lesión primaria en la MG. Sólo los autoanticuerpos anti-AChR son capaces de producir la activación del complemento. Esto se ha demostrado al encontrarse depósitos de C3, C9 e IgG en la placa motora (Engel et al., 1979). Sin embargo no se ha conseguido demostrar que los autoanticuerpos anti-MuSK sean capaces de activar la cadena del complemento.

Existen evidencias de que cambios en la concentración de componentes del complemento influye en la patogénesis de la MG: ratones de experimentación manipulados genéticamente con funciones del complemento reducidas son menos susceptibles o incluso resistentes al desarrollo de la enfermedad; el tratamiento con anticuerpos que bloquean diferentes componentes del complemento como C6, C5 o el receptor del complemento soluble 1 (CR1) protege de la MG autoinmune experimental (Liu et al., 2009; Soltys et al., 2009).

Se desglosan a continuación los hallazgos en los diferentes componentes del complemento estudiados en nuestro trabajo.

6.2.7.1. Componente C5

Recientemente, rEV576, un novedoso inhibidor del componente C5 del complemento ha sido desarrollado y empleado en la MG autoinmune experimental. Este fármaco demostró limitar la gravedad de la enfermedad. En humanos, drogas similares como pexelizumab y eculizumab ya han sido usadas en diferentes condiciones como el infarto de miocardio, la hemoglobinuria paroxística nocturna, el trasplante de pulmón y la cirugía con by-pass coronario. Ambos fármacos han demostrado seguridad, tolerancia y eficacia a corto plazo (Soltys et al., 2009). Pexelizumab es un anticuerpo monoclonal anti-C5 y eculizumab es un fragmento de cadena simple anti-C5.

Por tanto, parece razonable inferir que el uso de agentes bloqueadores de C5 podrían ser útiles en el tratamiento de MG en humanos, especialmente si se comprobase una correlación de C5 con la gravedad de la enfermedad y con los niveles de anticuerpos anti-AChR.

Desafortunadamente, no encontramos diferencias entre los niveles de C5 entre los pacientes y el grupo control. Existen pocas explicaciones para este hecho: 1) C5 podría no desempeñar un importante papel en la patogenia de la enfermedad, 2) nuestros pacientes tienen síntomas leves (reflejado por el hecho de que 16 de los 25 pacientes tenían MG ocular) con niveles de C5 relativamente bajos.

A pesar de estos resultados negativos, la idea de usar agentes bloqueantes de C5 no debería ser abandonada. Futuros trabajos con mayor número de pacientes y con sintomatología generalizada son necesarios para clarificar este tema.

6.2.7.2. Complemento C9

En este estudio hemos demostrado que los niveles séricos de C9 están incrementados en pacientes con MG, especialmente en aquellos pacientes con MG generalizada. Esto significa que los niveles de C9 en sangre se correlacionan con el estadio clínico de los pacientes.

Este incremento de C9 puede ser explicado por diferentes hechos: 1) depósitos de C9 (junto con C3 e IgG) han sido encontrados en la unión neuromuscular; 2) incrementos de C9 séricos también han sido informados en otras condiciones en las que la activación y la formación del complejo de ataque a la membrana están envueltas (cáncer de estómago, insuficiencia renal en pacientes en hemodiálisis y 3) ninguno de nuestros pacientes presentaba cualquier infección que pudiese explicar la activación del complemento. En conclusión, C9 está activado en la MG con un aumento de síntesis y es conducido a la placa motora donde desempeña su acción.

Por otra parte, no encontramos relación entre los niveles séricos de C9 con el título de anticuerpos anti-AChR en los pacientes seropositivos. Este hallazgo no debe sorprender considerando que el título de autoanticuerpos no se relaciona con la gravedad de la enfermedad.

Un hallazgo muy interesante es que encontramos una correlación negativa entre los niveles de C9 con los de C3. Los niveles de C3 en suero de pacientes con MG generalizada en pacientes con alto título de anti-AChR se encuentran disminuidos (Romi, 2011) y posiblemente relacionados con la gravedad de la enfermedad (Liu et al., 2009). El motivo por el que los niveles de C3 disminuyan y en cambio los de C9 se incrementen en el suero de pacientes con MG no está aclarado hasta la fecha. Sugerimos que habría que considerar el sistema del complemento no como un todo sino como una red de mediadores con funciones independientes para cada uno de los componentes del mismo y no considerarlo.

Considerando estos datos preliminares, podría ser útil monitorizar los niveles de C9 en sangre para comprobar una posible relación con la condición clínica en los pacientes de forma individual.

Juntando todos estos hallazgos, agentes que bloqueen al componente terminal C9 podrían ser considerados como futuras dianas para el tratamiento en MG. Para nuestro conocimiento, no hay estudios de este tipo de agentes en animales.

6.2.7.3. Otros componentes: C3, C4

No encontramos diferencias en los niveles séricos de C3 y C4 en pacientes con MG. Esto apoya informes previos. Este mismo estudio señaló que los niveles estaban disminuidos en pacientes con alto título de anticuerpo anti-AChR.

Otro estudio mostraba una correlación negativa entre los niveles de C3 y la gravedad de la enfermedad en pacientes también seropositivos.

7. CONCLUSIONES

7.1. Sección I: epidemiología

- ✓ La incidencia anual de MG en nuestro medio es de 3,25 por 100.000 habitantes.
- ✓ Hay una tendencia positiva en la incidencia de MG a expensas fundamentalmente del aumento de casos en la población anciana (incidencia anual de 8,81 por 100.000 habitantes en mayores de 70 años).
- ✓ La edad de debut en las mujeres con MG ocurre más precozmente en comparación a los hombres que tienden a debutar más tardíamente, después de los 50 años.
- ✓ La forma clínica más frecuente de presentación en MG es la ocular que aparece hasta en dos terceras partes de los pacientes.
- ✓ El título de anti-AChR es mayor en los pacientes con MG generalizada comparado con la MG ocular a pesar de que la seropositividad no es superior en la MG generalizada.
- ✓ La incidencia de timoma en pacientes con MG es menor del 5%. Como describe la literatura, es más frecuente la aparición en pacientes miasténicos seropositivos con edad de debut precoz y forma generalizada de la enfermedad.
- ✓ Existe una asociación de etiología heterogénea entre la MG y la presencia de linfoma.
- ✓ La MG se asocia de manera significativa con otras condiciones autoinmunes: alteraciones inmunes tiroideas, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, anemia perniciosa, especialmente en pacientes seropositivos.

7.2. Sección II: inmunología

- ✓ IFN- γ , citocina más representativa de la vía Th1, está incrementado en los pacientes con MG y especialmente en las formas más graves de la enfermedad. Podría considerarse como un marcador de gravedad de MG.
- ✓ No hemos encontrado ninguna utilidad clínica en la determinación de TNF- α en suero de pacientes con MG a pesar de existir informes sobre el beneficio terapéutico que supone el bloqueo de este mediador
- ✓ La citocina IL-17, dependiente de la vía Th17, está implicada en la patogenia con la MG. Sus niveles se relacionan con la gravedad de la enfermedad y especialmente en aquellos pacientes con anomalías tímicas.
- ✓ Las citocinas dependientes de la vía Th2, IL-6 e IL-10, no se encontraban elevadas en los pacientes con MG. Este hallazgo sugiere que pese a considerarse clásicamente la MG una enfermedad Th2-dependiente, su implicación patogénica no es determinante.
- ✓ Existía un consumo de los niveles séricos de sCD40L en pacientes con anomalías tímicas.

ANEXOS

Anexo I. Población aragonesa por grupos de edad y sexo

	Hombres	Mujeres	Total
0-19 años	124.637	117.489	242.126
20-29 años	85.761	79.551	165.312
30-39 años	118.430	105.000	223.430
40-49 años	107.698	99.878	207.576
50-59 años	84.999	82.889	167.888
60-69 años	65.909	69.629	135.538
70-79 años	51.951	63.537	115.488
80 ó más años	32.950	55.109	88.059
Total	672.335	673.082	1.345.417

Fuente: Instituto Nacional de Estadística de España. Censo del Año 2010.

Anexo II. Población española por grupos de edad y sexo

	Hombres	Mujeres	Total
0-19 años	4.310.242	4.087.179	8.397.421
20-29 años	3.418.406	3.264.483	6.682.889
30-39 años	3.372.068	3.296.960	6.669.028
40-49 años	2.810.547	2.826.277	5.636.824
50-59 años	2.285.677	2.360.857	4.646.534
60-69 años	1.863.915	2.077.302	3.941.217
70-79 años	1.425.889	1.862.789	3.288.678
80 ó más años	535.106	1.049.674	1.584.780
Total	20.021.850	20.825.521	40.847.371

Fuente: Instituto Nacional de Estadística de España. Censo del año 2001.

Anexo III. Población europea por grupos de edad y sexo

	Hombres	Mujeres	Total
0-19 años	55.158	52.427	107.585
20-24 años	16.287	15.699	31.987
25-29 años	17.176	16.707	33.884
30-34 años	17.694	17.227	34.922
35-39 años	18.523	18.179	36.702
40-44 años	19.158	18.910	38.068
45-49 años	18.211	18.310	36.521
50-54 años	16.867	17.333	34.200
55-59 años	15.527	16.330	31.857
60-64 años	13.478	14.528	28.006
65-69 años	11.281	12.821	24.102
70-74 años	9.656	11.972	21.627
75-79 años	7.309	10.284	17.593
80 o más años	7.604	15.047	22.651
Total	243.930	255.773	499.703

Fuente: DG Research and innovation. Datos: Eurostat.

Anexo IV. Población mundial por grupos de edad y sexo

	Total	Hombres	Mujeres
0-4 años	631.233.096	326.136.070	305.097.026
5-9 años	606.597.911	314.054.211	292.543.700
10-14 años	596.720.413	308.954.072	287.766.341
15-19 años	597.805.088	308.197.771	289.607.317
20-24 años	604.063.882	309.039.582	295.024.300
25-29 años	558.135.538	283.887.473	274.248.065
30-34 años	509.461.907	258.780.856	250.681.051
35-39 años	491.023.301	248.667.187	242.356.114
40-44 años	469.387.407	237.130.030	232.257.377
45-49 años	425.428.869	212.728.195	212.700.674
50-54 años	349.493.715	173.090.016	176.403.699
55-59 años	312.983.882	153.448.626	159.535.256
60-64 años	248.148.431	120.522.621	127.625.810
65-69 años	181.769.370	86.615.208	95.154.162

70-74 años	147.954.197	67.805.816	80.148.381
75-79 años	105.247.836	45.986.036	59.261.800
80-84 años	65.868.716	26.421.372	39.447.344
85-89 años	31.540.284	10.967.729	20.572.555
90-94 años	10.287.660	3.026.318	7.261.342
95-99 años	2.501.112	593.173	1.907.939
100 ó más años	391.374	76.121	315.253
Total	6.946.043.989	3.496.128.483	3.449.915.506

Fuente: U.S. Census Bureau. Año 2011.

Anexo V.A. Tabla resumen de las características clínico-epidemiológicas de la cohorte con MG.

Caso	Sexo	Edad	Fecha de reclutamiento	Inclusión en incidencia	Inclusión en inmunología
1	H	64	08/05/2009	Si	Si
2	M	78	15/05/2009	Si	Si
3	M	69	10/07/2009	No	Si
4	M	70	15/07/2009	Si	Si
5	M	26	07/09/2009	Si	Si
6	M	71	17/09/2009	No	Si
7	H	66	07/10/2009	Si	Si
8	H	78	11/11/2009	Si	Si
9	M	81	26/11/2009	Si	Si
10	H	66	15/12/2009	Si	Si
11	M	78	15/12/2009	Si	Si
12	H	62	19/01/2010	Si	Si
13	H	81	19/01/2010	Si	Si

14	H	68	27/01/2010	No	Si
15	H	72	13/05/2010	Si	Si
16	H	79	26/05/2010	Si	Si
17	M	36	11/06/2010	Si	Si
18	M	65	11/06/2010	Si	Si
19	H	87	11/06/2010	Si	Si
20	M	63	21/09/2010	Si	Si
21	M	40	09/08/2010	Si	Si
22	M	70	09/08/2010	Si	Si
23	H	57	03/01/2011	Si	Si
24	M	21	07/10/2010	Si	Si
25	H	62	06/10/2010	Si	Si
26	H	74	28/04/2011	Si	No
27	H	43	15/08/2010	Si	No
28	H	29	28/04/2011	Si	No
29	H	70	17/10/2010	Si	No

Anexo V.B. Tabla resumen de las características clínico-epidemiológicas de la cohorte con MG.

Caso	Anti-AChR (nmol/l)	Debut	Forma clínica	Clase MGFA
1	3,12	T	O	I
2	25,9	T	G	IVB
3	22,5	T	G	IIB
4	4,01	T	O	I
5	24,1	P	G	IIIB
6	17,5	T	O	I
7	0,89	T	O	I
8	-	T	O	I
9	6,18	T	G	IIA
10	5,35	T	O	I
11	-	T	G	IIB
12	8,51	T	O	I
13	5,66	T	O	I

14	0,18	T	O	I
15	14,5	T	G	IVA
16	5,76	T	O	I
17	0,29	P	O	I
18	7,78	T	G	IIIB
19	13,80	T	O	I
20	-	T	G	IIB
21	1,42	P	O	I
22	30,41	T	G	IIIB
23	-	T	O	I
24	0,18	P	O	I
25	-	T	O	I
26	5,67	T	O	I
27	19,60	P	G	IIB
28	5,11	P	O	I
29	6,06	T	O	I

Anexo V.C. Tabla resumen de las características clínico-epidemiológicas de la cohorte con MG.

Caso	Timo	AAN	Condiciones autoinmunes	Neoplasia
1	-	No	-	-
2	-	No	-	-
3	Hiperplasia	Si	Tiroiditis	-
4	-	No	-	Mama
5	Timoma	Si	LES, tiroiditis	Timo
6	-	No	-	-
7	-	No	AP	-
8	-	No	-	-
9	-	Si	-	-
10	-	No	-	-
11	-	No	-	-
12	-	No	-	-
13	-	No	-	-
14	-	No	-	-
15	-	No	-	Estómago
16	-	No	-	-
17	-	Si	-	-
18	-	Si	-	-

19	-	Si	-	-
20	-	No	-	-
21	-	No	-	-
22	-	Si	-	-
23	-	No	-	-
24	-	No	-	-
25	-	No	-	LNH
26	-	No	-	-
27	-	No	AR	-
28	-	No	-	-
29	-	No	-	-

AAN: anticuerpos antinucleares. AR: artritis reumatoide. LES: lupus eritematoso sistémico. AP: anemia perniciosa. LNH: linfoma no Hodgkin.

Bibliografía

Adikari SB, Lian H, Link H, et al. Interferon-gamma-modified dendritic cells suppress B cell function and ameliorate the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 2004;138:230-6.

Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 2002;71:1-8.

Aguiar Ade A, Carvalho AF, Costa CM, et al. Myasthenia gravis in Ceará, Brazil: clinical and epidemiological aspects. *Arq Neuropsiquiatr* 2010;68:843-8.

Ahlberg RE, Pirskanen R, Lefvert AK. Defective T lymphocyte function in nonthymectomized patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;60:93-105.

Almeida DF, Radaeli Rde F, Melo Jr AC. Ice pack test in the diagnosis of myasthenia gravis. *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66:96-98.

Aragonès JM, Bolívar I, Bonfill X, et al. Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology* 2003; 60:1024-6.

Aurangzeb S, Tariq M, Irshad M, et al. Relationship between anti-acetylcholine receptor antibody titres and severity of myasthenia gravis. *J Pak Med Assoc* 2009;59:289-92.

Baggi F, Ubiali F, Nava S, et al. Effect of IgG immunoadsorption on serum cytokines in MG and LEMS patients. *J Immunol* 2008;201-202:104-110.

Bai XF, Zhu J, Zhang GX, et al. IL-10 suppresses experimental autoimmune neuritis and down-regulates Th1-type immune response. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83:117-126.

Balandina A, Lécart S, Dartavelle P, et al. Functional defect of regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005;105:735-741.

Balasa B, Deng C, Lee J, et al. Interferon-gamma (IFN-gamma) is necessary for the génesis of acetylcholine receptor-induced clinical experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *J Exp Med* 1997;186:385-391.

Balasa B, Deng C, Lee J, et al. The Th2 cytokine IL-4 is not required for the progression of antibody-dependent autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol* 1998;161:2856-2862.

Balasa B, Sarvetnick N. Is pathogenic humoral autoimmunity a Th1 response? Lessons from (for) myasthenia gravis. *Immunol Today* 2000;21:19-23.

Baron RL, Lee JK, Sagel SS, et al. Computed tomography of the abnormal thymus. *Radiology* 1982;142:127-134.

Bennett DL, Mills KR, Riordan-Eva P, et al. Anti-MuSK antibodies in a case of ocular myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:564-565.

Benveniste O, Hilton-Jones D. The role of rituximab in the treatment of myasthenia gravis. *Eur Neurol Rev* 2010;5:95-100.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th27 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.

Blanco FJ, Cañete JD, Pablos JL. Técnicas de investigación básica en reumatolgoía. Sociedad Española de Reumatología. Madrid (España): Panamericana;2007.

Blotta MH, DeKruyff RH, Umetsu DT. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocyte. *J Immunol* 1997;158:5589-5595.

Bottomly K. A function dichotomy in CD4+T lymphocytes. *Immuno Today* 1988;9:268-274.

Brocke S, Brautbar C, Steinman L, et al. In vitro proliferative responses and antibody titers specific to human acetylcholine receptor synthetic peptides in patients with myasthenia gravis. *J Clin Invest* 1988;82:894-900.

Buckley C, Willcox N, Newson-Davis J, et al. Do titin and cytokine antibodies in MG patients predict thymoma or thymoma recurrence? *Neurology* 2001;57:1579-1582.

Cavalcante P, Le Panse R, Berrih-Aknin S, et al. The thymus in myasthenia gravis: site of “innate autoimmunity”? *Muscle Nerve* 2011;44:467-484.

Chatzistefanou KI, Kouris T, Iliakis E, et al. The ice pack test in the differential diagnosis of myasthenic diplopia. *Ophthalmology* 2009;116:2236-2243.

Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-1886.

Chen Z, O’Shea JJ. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine* 2008;41:71-78.

Christadoss P, Goluszko E. Treatment of experimental autoimmune myasthenia gravis with recombinant human tumor necrosis factor receptor Fc protein. *J Neuroimmunol* 2002;122:186-190.

Cohen-Kaminsky S, Devergne O, Delattre RM, et al. IL-6 overproduction by cultured thymic epithelial cells from patients with myasthenia gravis is potentially involved in thymic hyperplasia. *Eur Cytokine Network* 1993;4:121-132.

Connell L, McInnes IB. New cytokine targets in inflammatory rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:865-878.

Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 2006;116:2843-2854.

Cook IJ. Oropharyngeal dysphagia. *Gastroenterol Clin North Am* 2009; 38:411-31

Cua DJ, Groux H, Hinton DR, et al. Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental encephalomyelitis. *J Exp Med* 1999;2:139:165.

Cunha FM, Scola RH, Werneck LC. Myasthenia gravis. Clinical evaluation of 153 patients]. *Arq Neuropsiquiatr* 1999 57:457-64.

Dalakas MC. Inhibition of B cell functions. *Neurology* 2008; 70:2252-2260.Review.

De Feo LG, Schottlender J, Martelli NA, et al. Use of intravenous pulsed cyclophosphamide in severe, generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2002;26:31-36.

Deymeer F, Gungor-Tuncer O, Yilmaz V, et al. Clinical comparison of anti-MuSK-vs anti-AChR-positive and seronegative myasthenia gravis. *Neurology* 2007;68:609-611.

Dinarello CA, Novik D, Puren AJ, et al. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc boil* 1998;63:658-664.

Doreau A, Alexandre Belot A, Bastid J, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 2010;10:778–787

Duan RS, Wang HB, Yang JS, et al. Anti-TNF-alpha antibodies suppress the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun* 2002;19:169-174.

El-behi M, Rostami A, Ciric B. Current views on the roles of Th1 and Th7 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;5:189-197.

Engel AG, Sakakibara H, Sahashi K, et al. Passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis. Sequential and quantitative study of the motor end-plate fine structure and ultrastructural localization of immune complexes (IgG and C3), and of the acetylcholine receptor. *Neurology* 1979;29:179-88.

Farrugia ME, Jacob S, Sarrigiannis PG, et al. Correlating extent of neuromuscular instability with acetylcholine receptor antibodies. *Muscle Nerve* 2009;39:489-93.

Fattorossi A, Battaglia A, Buzzonetti A, et al. Circulating and thymic CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment. *Immunology* 2005;116:134-141.

Eng, H, Lefvert, AK, Mellstedt, H, et al. Human monoclonal immunoglobulins that bind the human acetylcholine receptor. *Eur J Immunol* 1987; 17:1867-1869.

Flachenecker P. Epidemiology of neuroimmunological diseases. *J Neurol* 2006;253(Suppl 5):V2-V8.

Ertekin C, Yüceyar N, Aydogdu I. Clinical and electrophysiological evaluation of dysphagia in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65:848-56.

Ferreira S, Lage P, Claro I, et al. Dysphagia and dysarthria: unusual presentation of myasthenia gravis. *Acta Med Port* 2007; 20:463-6.

Furlan R, Martino G, Galbiati F, et al. Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination. *J Immunol* 1999; 163:240-2409.

Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183:2593-2603.

Gajdos P, Chevret S. Treatment of myasthenia gravis acute exacerbations with intravenous immunoglobulin. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:271-5.

Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, et al. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 1996;85:525-535.

Giraud M, Vandiedonck C, Garchon HJ. Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:180-192.

Gabrielli GB, Codella O, Capra F, et al. Pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and myasthenia gravis. A case report. *Haematologica* 1998;83:381-2

Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immuno Rev* 1996;153:85-106.

Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, et al. Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 1996;273:1864-1867.

González RJ, Chaves E, Copello H. Dysphagia as the sole manifestation of myasthenia gravis. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2010; 40:156-8.

Grewal IS, Xu J, Flavell A. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* 1995;378:617-620.

Grob D, Brunner N, Namba T, et al. Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2008;37:141-149.

Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology). *Neurology* 2000;55:7-15.

Harcourt GC, Sommer N, Rothbard J, et al. A juxtamembrane epitope on the human acetylcholine receptor recognized by T cells in myasthenia gravis. *J Clin Invest* 1988;82:1295-1300.

Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 2000;1:475-482.

He XT, Liu WB, Feng HY, et al. The role of CD4⁺CD25⁺ T cells in the mechanism of myasthenia gravis in children and adults. *Chin Med J* 2008;88:3189-3191.

Heatwole C, Ciafaloni E. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis: a clear and present controversy. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008;4:1203-1209.

Heckmann JM, Rawoot A, Bateman K, et al. A single-blinded trial of methotrexate versus azathioprine as steroid-sparing agents in generalized myasthenia gravis. *BMC Neurol* 2011;11:97.

Hibi M, Murakami M, Saito M, et al. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp30. *Cell* 1990;63:1149-1157.

Hirano T. IL-6 and its receptor. *Int Rev Immunol* 1998;16:249-284.

Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324:73-76.

Hoch W, McConville J, Helms S, et al. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001;7:365-368.

Hollfeld R, Wekerle H. Reflections on the “intrathymic pathogenesis” of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2008;201-202:21-27.

Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, et al. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide. *Arthritis Rheum* 2002;46:2121-2131.

Howard M, O'Garra A. Biological properties of IL-10. *Immunol Today* 1992;13:198-200.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS et al. Development of Th1CD4⁺T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993;260:547-549.

Hsu HC, Yang P, Wang J et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008; 9:166–75.

Huang DR, Zhou YH, Xia SQ, et al. Markers in the promoter region of interleukin-10 (IL-10) gene in myasthenia gravis: implications of diverse effects of IL-10 in the pathogenesis of the disease. *J Neuroimmunol* 1999;94:82-87.

Huang S, Tan LM. Research advancement in immunopathogenesis of myasthenia gravis. *Neurosci Bull* 2010;26:85-89.

Huang MH, King KL, Chien KY. Esophageal manometric studies in patients with myasthenia gravis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95:281-5.

Huisman MH, de Jong SW, Verwijs MC, et al. Family history of neurodegenerative and vascular diseases in ALS: a population-based study. *Neurology* 2011;77:1363-1369.

Im SH, Barchan D, Maiti PK, et al. Suppression of experimental myasthenia gravis, a B cell-mediated autoimmune disease, by blockade of IL-18. *FASEB J* 2001;15:2140-2148.

Im SH, Barchan D, Maiti PK, et al. Blockade of CD40 ligand suppresses chronic experimental myasthenia gravis by down-regulation of th1 differentiation and up-regulation of CTLA-4. *J Immunol* 2001;166:6893-6898.

Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi T, et al. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W mice. *J Exp Med* 1994;179:305-310.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-1133.

Jacob S, Viegas S, Lashley D, et al. Myasthenia gravis and other neuromuscular junction disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;9:364-371.

Jander S, Stoll G. Increased serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 in myasthenia gravis. *Neurology* 2000;59:287-289.

Jander S, Stoll G. Interleukin-18 is induced in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 2001;114:253-258.

Jaretzki A III, Barohn RJ, Ernstoff RM, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology* 2000;55:16-23.

Kakoulikou M, Bjelak S, Pirskanen R, et al. A clinical and immunological study of a myasthenia gravis patient treated with infliximab. *Acta Neurol Scand* 2007;115:279-283.

Kalled SL. Impact of the BAFF/BR3 axis on B cell survival, germinal center maintenance and antibody production. *Semin Immunol* 2006;18:290-296.

Keeseey J, Naiem F, Lindstrom J, et al. Acetylcholine receptor antibody titer and HLA-B8 antigen in myasthenia gravis. *Arch Neurol* 1982 ;39:73-7.

Kim JY, Yang Y, Moon JS, et al. Serum BAFF expression in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2008;199:151–154.

Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010;40:1830–1835.

Kirchner T, Scharke M, Melms A, et al. Immunohistochemical patterns in non-neoplastic changes in the thymus in myasthenia gravis. *Virchow Arch B* 1986;52:237-257.

Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* 1992;258:593-597.

Korn T, Oukka M, Kuchroo V et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007;19:362-371.

Kupersmith MJ, Latkany R, Homel P. Development of generalized disease at 2 years in patients with ocular myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2003;60:243-8.

Lang B, Pinto A, Giovannini F et al. Pathogenic autoantibodies in the Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Ann NY Acad Sci* 2003;998:187-195.

Lange B, Vincent A. Autoantibodies to ion channels at the neuromuscular junction. *Autoimmun Rev* 2003;2:94-100.

Lederman S, Yellin MJ, Cleary AM et al. T-BAM/CD40-L on helper T lymphocytes augments lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and rescues B cells from programmed cell death. *J Immunol* 1994;152:2163-2171.

Lee AB, Godfrey T, Rowley KG et al. Traditional risk factor assessment does not capture the extent of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus. *Intern Med J* 2006;36:237-243.

Lee JS, Joo SI, Seok IJ. Widely varying TNF- α levels in patients with myasthenia gravis. *Neurol Sci* 2009;30:259-262.

Leite MI, Jacob S, Viegas S, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain* 2008;131:1940-1952.

Li X, Xiao B-G, Xi J-Y, et al. Decrease of CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T cells and elevation of CDD19⁺BAFF-R⁺ B cells and soluble ICAM-1 in myasthenia gravis. *Clin Immunol* 2008;126:180-188.

Lindström JM, Seybold ME, Lennon VA, et al. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. 1975. *Neurology* 1998;51:933-939.

Lindström JS, Seybold ME, Lennon VA, et al. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: prevalence, clinical correlates and diagnostic value. *Neurology* 1976;26:1054-1059.

Liu A, Lin H, Liu Y, et al. Correlation of C3 level with severity of generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2009; 40:801-808.

Llabrés M, Molina-Martínez FJ, Miralles F. Dysphagia as the sole manifestation of myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:1297-300.

López-Pedrera C, Aguirre MA, Barbarroja N et al. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010. pii: 607084. Epub 2010 Sep 26. Review.

Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003;21:231-264.

Maggi L, Andreatta F, Antozzi C, et al. Two cases of thymoma-associated myasthenia gravis without antibodies to the acetylcholine receptor. *Neuromuscul Disord* 2008;18:678-680.

Maggi G, Casadio C, Cavallo A, et al. Thymoma: results of 241 operated cases. *Ann Thorac Surg* 1991;51:152-156.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage. *Nature* 2006;441:231-234.

Mao ZF, Yang LX, Mo XA, et al. Frequency of autoimmune diseases in myasthenia gravis: a systematic review. *Int J Neurosci* 2011;121:121-9.

Marsteller HB. The first American case of myasthenia gravis. *Arch Neurol* 1988;45:185-187.

Martin F, Chan AC. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol* 2006;5:564-576.

Masuda M, Tanaka S, Nakajim K, et al. Clinical implications of the type1/type2 balance of helper T cells and P-glycoprotein function in peripheral T lymphocytes of myasthenia gravis patients. *Eur J Pharmacol* 2010;627:325-331.

Matsui N, Nakane S, Saito F, et al. Undiminished regulatory T cells in the thymus of patients with myasthenia gravis. *Neurology* 2010;74:816-820.

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;8:1390-1397.

McGrogan A, Sneddon S, de Vries CS. The incidence of myasthenia gravis: a systemic literature review. *Neuroepidemiology* 2010;34:171-83.

McIntyre K, McVaugh-Smock S, Mourad O. An adult patient with new-onset dysphagia. *CMAJ* 2006; 175:1203-5.

Meyer A, Levy Y. Geoepidemiology of myasthenia gravis. *Autoimmun Rev* 2010;9:A383-A386.

Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol* 2009;8:475-490.

Merrill JE, Kono DH, Clayton J, et al. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:574-578.

Min B, Prout M, Hu-Li J. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med* 2004;200:507-517.

Minami N, Fujiki N, Doi S, et al. Five-year follow-up with low-dose tacrolimus in patients with myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2011;300:59-62.

Moore PA, Belvedere O, Orr A, et al. Blys: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 1999;285:160-263.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T-cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.

Mu L, Sun B, Kong Q, et al. Disequilibrium of T helper type 1, 2 and 17 cells and regulatory T cells during the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Immunology* 2009;128(1 Suppl):e826-836.

Nagvekar N, Moody AM, Moss P, et al. A pathogenetic role for the thymoma in myasthenia gravis. Autosensitization of IL-4-producing T cell clones recognizing extracellular acetylcholine receptor epitopes presented by minority class II isotypes. *J Clin Invest* 1998;101:2268-2277.

Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 2001;97:198-204.

Nath, A, Kerman, RH, Novak, IS, et al. Immune studies in human immunodeficiency virus infection with myasthenia gravis: a case report. *Neurology* 1990; 40:581-583.

Newsom-Davis J, Pinching AJ, Vincent A, et al. Function of circulating antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: investigation by plasma exchange. *Neurology* 1978; 28: 266–272.

Nicholson LB, Greer JM, Sobel RA, et al. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune myasthenia gravis in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2003;170:604-612.

Niks EH, Kuks JB, Verschuuren JJ. Epidemiology of myasthenia gravis with anti-muscle specific kinase antibodies in The Netherlands. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:417-8.

Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K. Anticytokine therapy in autoimmune diseases. *InternMed* 1999;38:178-182.

Nishimoto N, Terao K, Mima T, et al. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 and soluble IL-6 receptor after administration of an anti IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 2008;112:3959-3964.

Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, et al. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999;10:127-136.

Okumura M, Inoue M, Kadota Y, et al. Biological implications of thymectomy for myasthenia gravis. *Surg Today* 2010;40:102-107.

Oosterhuis HJGH. The natural course of myasthenia gravis: a long term follow up term. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:1121-1127.

Palace J, Newsom-Davis J, Lecky B. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. *Neurology* 1998;50:1778-1783.

Panitch HS. Interferons in multiple sclerosis. A review of the evidence. *Drugs* 1992;44:946-962.

Peter HH, Warnatz K. Molecules involved in T-B costimulation and B cell homeostasis: possible targets for an immunological intervention in autoimmunity. *Exp Opin Biol Ther* 2005; 5 suppl1:S61-71. Review.

Park YB, Lee SK, Kim DS, et al. Elevated IL-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:283-288.

Phillips 2nd LH, Torner JC. Epidemiologic evidence for a changing natural history of myasthenia gravis. *Neurology* 1996;47:1233-1238.

Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol* 1993;23:2223-2229.

Punga AR, Flink R, Askmark H, et al. Cholinergic neuromuscular hyperactivity in patients with myasthenia gravis seropositive for MuSK antibody. *Muscle Nerve* 2006;34:111-115.

Racke MK, Bonomo A, Scott DE, et al. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease 1994;180:1961-1966.

Ragueb S, Bealmear B, Lisak R. Cell-surface expression of lymphocyte activation markers in myasthenia gravis. *Autoimmunity* 1999; 31:55-66.

Ragheb S, Lisak R, Lewis R, et al. A potential role for B-cell activating factor in the pathogenesis of autoimmune myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2008;65:1358-1362.

Ramírez F, Fowell DJ, Puklavec M, et al. Glucocorticoids promote a Th2 cytokine response by CD4⁺ T cells in vitro. *J Immunol* 1996;156:2406-2412.

Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, et al. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1994;178:87-99.

Rezania K, Soliven B, Baron J, et al. Myasthenia gravis, an autoimmune manifestation of lymphoma and lymphoproliferative disorders: case reports and review of literature. *Leuk Lymphoma* 2012;53:371-80.

Rigamonti A, Lauria G, Piamarta F, et al. Thymoma-associated myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *J Neurol Sci* 2011;302:112-113.

Romi F. Thymoma in myasthenia gravis: from diagnosis to treatment. *Autoimmune Dis* 2011;2011:475512.

Romi F, Aarli JA, Gilhus NE. Myasthenia gravis patients with ryanodine receptor antibodies have distinctive clinical features. *Eur J Neurol* 2007;14:617-620.

Romi F, Bo L, Skeie GO, et al. Titin and ryanodine epitopes are expressed in cortical thymoma along with costimulatory molecules. *J Neuroimmunol* 2002;128:82-89.

Rowin J, Meriggioli MN, Tüzün E, et al. Etanercept treatment in corticosteroid-dependent myasthenia gravis. *Neurology* 2004;63:2390-2392.

Rowin J. Etanercept treatment in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 2008;1132:300-04.

Ruddy MJ, Shen F, Smith JB et al. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol* 2004;76:135-144.

Saag KG. Prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis. *South Med J* 2004;97:555-558.

Saeland S, Duvert V, Moreau I, et al. Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation. *J Exp Med* 1993;178:113-120.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531:562.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-787.

Sanes JR, Lichtman JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:791-805.

Saoudi A, Bernard I, Hoedemaekers A, et al. Experimental autoimmune myasthenia gravis may occur in the context of a polarized Th1- or Th2-type immune response in rats. *J Immunol* 1999;162:7189-7197.

Scharton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that derives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med* 1993;178:567-577.

Schluep M, Willcox N, Vincent A, et al. Acetylcholine receptor in human thymic myoid cells in situ: an immunological study. *Ann Neurol* 1987; 22:212-222.

Schneider P, MacKay F, Steiner v, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 1999;189:1747-1756.

Schönbeck U, Mach F, Libby P. CD154(CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32:687-693.

Shandley S, Martinez S, Krolick K. IL-4 receptor as a bridge between the immune system and muscle in experimental myasthenia gravis. *Clin Immunol* 2009;132:246- 56.

Shi FD, He B, Li H, et al. Differential requirements for CD28 and CD40 ligand in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol* 1998;28:3587-3593.

Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2006;26:987-994.

Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature* 2002;420:825-829.

Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Natu Rev Immunol* 2001;1:147-153.

Simpson JA. Myasthenia gravis: a new hypothesis. *Scott Med J* 1960; 5:419-436.

Skeie GO, Apostolski S, Evoli A, et al. Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol* 2010;17:893-902.

Soltys J, Kusner LL, Young A, et al. Novel complement inhibitor limits severity of experimentally myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2009;65:67-75.

Sperling AI, Bluestone JA. The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond. *Immunol Rev* 1996;153:155-182.

Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009;78:539-552.

Spuler, S, Sarropoulos, A, Marx, A, et al. Thymoma-associated myasthenia gravis: transplantation of thymoma and extrathymomal thymic tissue into SCID mice. *Am J Pathol* 1996; 148:1359-1364.

Stoeger Z, Neiman A, Elbirt D, et al. High prevalence of systemic lupus erythematosus in 78 myasthenia gravis patients: a clinical and serologic study. *Am J Med Sci* 2006;331:4-9.

Stockinger B, Beldhøen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19:281-286.

Stout RD, Sutiles J, Xu J, et al. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol* 1996;156:8.

Ströbel P, Rosenwald A, Beyersdorf N, et al. Selective loss of regulatory T cells in thymomas. *Ann Neurol* 2004;56:901-904.

Sun Y, Qiao J, Lu CZ, et al. Increase of circulating CD4⁺ CD25⁺ T cells in myasthenia gravis patients with stability and thymectomy. *Clin Immunol* 2004;112:284-289.

Suzuki et al.. RyR Tacrolimus 2011.

Tindall RS, Rollins JA, Phillips JT, et al. Preliminary results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *N Eng J Med* 1987;316:719-724.

Tomelleri G, Vattemi G, Filosto M, et al. Eyelid ptosis from sympathetic nerve dysfunction mistaken as myopathy: a simple test to identify this condition. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:632-634.

Tüzün E, Meriggioli MN, Rowin J. Myasthenia gravis with low plasma IL-6 and IFN- γ benefit from etanercept treatment. *J Autoimmun* 2005;24:261-268.

Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008;172:146-155.

Uono M. Clinical statistics of myasthenia gravis in Japan. *Int J Neurol* 1980;14:87-99.

Vakkalanka RK, Woo C, Kirou KA et al. Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum* 1999;42:871-881.

Veldhoe M, Hocking RJ, Atkins CL, et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179-189.

Vernino S, Cheshire WP, Lennon VA. Myasthenia gravis with autoimmune autonomic neuropathy. *Auton Neurosci* 2001; 88:187-92.

Vernino S, Hopkins S, Wang Z. Autonomic ganglia, acetylcholine receptor antibodies and autoimmune ganglionopathy. *Auton Neurosci* 2009; 146:3-7. Review.

Vincent A, Scadding GK, Thomas HC, et al. In vitro synthesis of anti-acetylcholine-receptor antibody by thymic lymphocytes in myasthenia gravis. *Lancet* 1978;1:305-307.

Vincent A. Immunology of disorders of neuromuscular transmission. *Acta Neurol Scand* 2006;113:1-7.

Vincent A, Leite MI. Neuromuscular junction autoimmune disease: muscle specific kinase antibodies and treatments for myasthenia gravis. *Curr Opin Neurol* 2005;18:519-525.

Vincent A, Palace J, Hiltz-Jones D. Myasthenia gravis. *Lancet* 2001;357:2122-2128.

Vincent A, Willcox N, Hill M, et al. Determinant spreading and immune responses to acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Immuno Rev* 1998;164:157-168.

Wang, ZY. Myasthenia in SCID mice grafted with myasthenic patient lymphocytes: role of CD4⁺ and CD8⁺ cells. *Neurology* 1999; 52:484-497.

Wang Y, Campbell HD, Young IG. Sex hormones and dexamethasone modulate interleukin-5 gene expression in T lymphocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;44:203-210.

Wekerle H, Ketelsen UP, Zurn AP, et al. Intrathymic pathogenesis of myasthenia gravis: transient expression of acetylcholine receptors of thymus-derived muscle cells. *Eur J Immunol* 1978;8:579-583.

Wild JS, Sigounas A, Sur N, et al. IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Immunol* 2000; 164:2701-2710.

Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010;11:7-13.

Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A et al. IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GR0 α chemokine from mesothelial cells. *J Immunol* 2000;11:2044-2055.

Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000;9:589-593.

Xiao BG Duan RS, Zhu WH, et al. The limitation of IL-10-exposed dendritic cells in the treatment of experimental autoimmune myasthenia gravis and myasthenia gravis. *Cell Immunol* 2006;241:95-101.

Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptor ROR α and ROR γ . *Immunity* 2008;28:29-39.

Yapici Z, Tüzün E, Altunayoğlu V, et al. High interleukin-10 production is associated with anti-acetylcholine receptor antibody production and treatment response in juvenile myasthenia gravis. *Int J Neurosci* 2007;117:1505-1512.

Yazdany J, Davis J. The role of CD40 ligand in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004;13:377-380.

Yeh JH, Wang SH, Chien PJ, et al. Changes in serum cytokine levels during plasmapheresis in patients with myasthenia gravis. *Eur J Neurol* 2009;16:1318-22.

Yokota S, Imagawa T, Mori M, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet* 2008;371:998-1006.

Youinou P, Jamin C. The weight of interleukin-6 in B cell-related autoimmune disorders. *J Autoimmun* 2009;32:206-210.

Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;201:703-711.

Zhang GX, Navikas V, Link H. Cytokines and the pathogenesis of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 1997;20:543-551.

Zhang GX, Xiao BG, Yu LY, et al. Interleukin 10 aggravates experimental autoimmune myasthenia gravis through inducing Th2 and B cell responses to AChR. *J Neuroimmunol* 2001;113:10-18.

Zhang X, Yang M, Xu J, et al. Clinical and serological study of myasthenia gravis in HuBei province. China. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:386-390.

Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 2008;453:236-240.

Zou JX, Rudwaleit M, Brandt J, et al. Up regulation of the production of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma by T cells in ankylosing spondylitis during treatment with etanercept. *Ann Rheum Dis* 2003;62:561-564.