



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



TESIS DOCTORAL

**NUEVOS BIOMARCADORES DE
ENFERMEDAD Y PRONÓSTICO EN
MIASTENIA GRAVIS**

ELENA CORTÉS VICENTE

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS BIOMARCADORES
DE ENFERMEDAD Y PRONÓSTICO
EN MIASTENIA GRAVIS**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor

Doctoranda:

Elena Cortés Vicente

Directora:

Dra. Isabel Illa Sendra



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

BARCELONA - 2018

A mi madre, Pili

A mi abuela, Palmira

Una tesi doctoral és un llarg camí d'il·lusió, aprenentatge, treball i esforç. En aquest camí, és imprescindible estar rodejat de persones que t'ajudin, donin ànims i confiïn en tu. Aquesta tesi no és només meua, molta gent ha sigut fonamental per desenvolupar-la.

Vull donar les gràcies a la Isabel, per confiar en mi i donar-me l'oportunitat de formar part d'aquesta Unitat. Per deixar-me aprofitar els recursos que té la Unitat gràcies al seu treball durant tants anys. Per transmetre'm coneixements i passió per aquesta malaltia, que és tant important per a ella i que ara ho és per a mi també. Per ajudar-me a créixer, com a neuròloga, investigadora i persona.

Gràcies al Ricard, per la seua implicació desinteressada en la meua formació. Per tractar-me des del primer dia com a una igual. Per demanar-me opinió, i a més escoltar-la. Per fer-me veure que no són incompatibles la humilitat i l'excel·lència. Per ser company i amic. Per tot lo que m'ha ensenyat, no només de Neuromuscular.

Gràcies a la Janina i a la Sonia, per la seua amistat. Pel seu recolzament incondicional en els moments d'estrès i desesperació. Pels riures.

Gràcies a l'Edu i la Noemí, per la seua paciència i generositat. Per la seua total disponibilitat i inestimable ajuda al laboratori.

Gràcies al Jordi i al Luis, per transmetre'm el seu entusiasme per la patologia Neuromuscular i la recerca. Pels seus valuosos consells.

Gràcies a la resta de companys de la Unitat: Sebas, Alicia, Xavi, Fina, Ana Siles, Ana Carrasco, Esther, Cinta i Patricia. Per la seua companyia i suport en el camí.

Gràcies al servei de Neurologia de Sant Pau, per donar-me la base, el punt de partida. Gràcies al director del servei, adjunts i residents, infermeres, auxiliars i personal administratiu, per fer-me sentir com a casa.

Gracias a Chema, por diseñar la portada de esta tesis.

Gracias a mi madre y a mi abuela, por enseñarme que con esfuerzo y trabajo todo se puede. Por no cortar nunca las alas de mi curiosidad. Por dejarme libre para crecer. Por apoyarme siempre.

Gracias a mis amigos de Castellón y Mosqueruela, por demostrar que la distancia no deteriora la amistad. Por todos los años vividos juntos, y los que vendrán.

***“El cerebro no es un vaso por llenar,
sino una lámpara por encender”***

Plutarco

La Miastenia Gravis (MG) es una enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos frente a antígenos de la unión neuromuscular. El 80% de los pacientes presentan anticuerpos anti-receptor de acetilcolina, un 5% presenta anticuerpos anti-tirosin-kinasa específica de músculo (MuSK) y un 15% no presenta anticuerpos frente a estos dos antígenos, entidad conocida como MG seronegativa. En el caso de las formas oculares puras, hasta un 50% de los pacientes son seronegativos. El diagnóstico inmunológico de los pacientes tiene implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas. En el caso de la MG anti-MuSK, la descripción de los anticuerpos definió un subgrupo de pacientes con unas características clínicas comunes y una excelente respuesta a rituximab.

En el primer artículo de esta tesis se describe la frecuencia de los anticuerpos anti-cortactin en MG seronegativa así como el fenotipo clínico de estos pacientes. En nuestra serie, los anticuerpos anti-cortactin están presentes en un 24% de pacientes con MG seronegativa, un 9.5% de los pacientes con MG anti-RACH (porcentaje significativamente menor), y no se asocian con anticuerpos anti-MuSK, anti-LRP4 o anti-musculo estriado. Este hecho sugiere que los anticuerpos anti-cortactin no son consecuencia de epitope spreading. Los pacientes con MG seronegativa y anticuerpos anti-cortactin tienen un fenotipo ocular o generalizado leve, MGFA I o IIA, sin síntomas bulbares. Por tanto, la presencia de los anticuerpos anti-cortactin ayuda en el diagnóstico de la MG autoinmune, especialmente en los casos de MG ocular, y apoya el tratamiento con inmunosupresores si es clínicamente necesario.

El segundo artículo de esta tesis demuestra que la posología de rituximab utilizada en el tratamiento de la MG anti-MuSK fármacorresistente determina la frecuencia de recaídas y la duración del efecto beneficioso. Se conoce que el rituximab es una opción terapéutica eficaz para pacientes con MG anti-MuSK resistentes a otros fármacos inmunosupresores, sin embargo la posología utilizada para el tratamiento de los pacientes con MG anti-MuSK varía mucho entre diferentes centros. En este estudio, se compara el efecto beneficioso de tres posologías de rituximab diferentes. Todos los pacientes lograron un MGFA-PIS de remisión completa estable, remisión farmacológica o manifestaciones mínimas, y la prednisona y otras terapias inmunosupresoras se retiraron o redujeron en todos los casos. Sin embargo, el número de recidivas y la duración

de la respuesta fueron significativamente diferentes dependiendo del protocolo de rituximab utilizado. El protocolo 4+2 (375 mg/m² cada semana durante 4 semanas consecutivas y luego mensualmente durante los siguientes 2 meses) de rituximab demostró tener la tasa de recidiva clínica más baja y el efecto más duradero comparado con los protocolos 1+1 (dos dosis de 1 g separadas por 2 semanas) y 4 (375 mg/m² cada semana durante 4 semanas consecutivas). Por este motivo, en MG con anticuerpos anti-MuSK proponemos estandarizar el tratamiento con rituximab utilizando el protocolo 4+2.

En resumen, esta tesis aporta conocimiento sobre nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos en MG. Los hallazgos de esta investigación son directamente aplicables a la práctica clínica y abren interesantes nuevas líneas de investigación en el campo.

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease mediated by antibodies against antigens of the neuromuscular junction. Around an 80% of patients have anti-acetylcholine receptor antibodies (RACH), 5% have anti-muscle-specific tyrosine kinase (MuSK) antibodies and 15% have no antibodies to these two antigens, an entity known as seronegative MG. In pure ocular forms, up to 50% of patients are seronegative. The immunological diagnosis of patients has diagnostic, prognostic and therapeutic implications. In the case of anti-MuSK MG, the finding of the antibodies defined a subgroup of patients with common clinical characteristics and an excellent response to rituximab.

The first article of this thesis describes the frequency of anti-cortactin antibodies in seronegative MG as well as the clinical phenotype of these patients. In our series, anti-cortactin antibodies are present in 24% of patients with seronegative MG, 9.5% of patients with anti-RACH MG (a significantly lower percentage), and do not associate with anti-MuSK, anti-LRP4 or anti-striated muscle antibodies. This fact suggests that anti-cortactin antibodies are not a consequence of epitope spreading. Patients with seronegative MG and anti-cortactin antibodies have a mild ocular or generalized phenotype, MGFA I or IIA, without bulbar symptoms. Therefore, the presence of anti-cortactin antibodies helps in the diagnosis of autoimmune MG, especially in cases of ocular MG, and supports treatment with immunosuppressants if clinically necessary.

The second article of this thesis shows that the posology of rituximab used in the treatment of drug-resistant anti-MuSK MG determines the frequency of relapses and the duration of the beneficial effect. It is known that rituximab is an effective therapeutic option for patients with anti-MuSK MG resistant to other immunosuppressive drugs; however the posology used for the treatment of patients with anti-MuSK MG varies between different centers. In this study, the beneficial effect of three different rituximab posologies is compared. All patients achieved a stable complete remission, pharmacological remission or minimal manifestations MGFA-PIS, and prednisone and other immunosuppressive therapies were withdrawn or reduced in all cases. However, the number of relapses and the duration of the response were significantly different depending on the protocol of rituximab used. The 4+2 protocol (375 mg/m² every week for 4 consecutive weeks and then monthly for the next 2 months) of rituximab proved to have the lowest clinical recurrence rate

and the most lasting effect compared to the 1+1 protocol (two doses of 1 g separated by 2 weeks) and 4 protocol (375 mg/m² each week for 4 consecutive weeks). For this reason, in MG with anti-MuSK antibodies we propose to standardize treatment with rituximab using the 4+2 protocol.

In summary, this thesis provides knowledge on new diagnostic biomarkers and prognosis in MG. The findings of this research are directly applicable to clinical practice and open up interesting new lines of research in the field.

ACh:	Acetilcolina
CIDP:	Poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
EOMG:	Early-onset Myasthenia Gravis
HEK293:	Human embryonic kidney cells 293
HLA:	Antígeno leucocitario humano
IGEV:	Inmunoglobulina endovenosa
IGSC:	Inmunoglobulina subcutánea
LOMG:	Late-onset Myasthenia Gravis
LRP4:	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4
MG:	Miastenia Gravis
MGFA:	Myasthenia Gravis Foundation of America
MGFA-PIS:	Estado post-intervención de la MGFA
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIR:	Región inmunogénica mayor
MuSK:	Receptor de tirosin-kinasa específico de músculo
QMG:	Quantitative Myasthenia Gravis score
RACH:	Receptor de acetilcolina
RIA:	Radioinmunoensayo
Th:	Linfocito T helper
TLR:	Toll-like receptor
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TPMP:	Tiopurinametiltransferasa
Treg:	Linfocito T regulador
UNM:	Unión neuromuscular
VATS:	Video-assisted thoracoscopic surgery
VEB:	Virus de Epstein-Barr
3,4-DAP:	3,4-Diaminopiridina

I. AGRADECIMIENTOS

II. RESUMEN/ABSTRACT

III. ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DEFINICIÓN DE MIASTENIA	3
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	3
1.3. FISIOPATOLOGÍA.....	5
1.3.1. <i>La unión neuromuscular</i>	5
1.3.2. <i>Autoanticuerpos</i>	7
1.3.3. <i>Mecanismos etiológicos</i>	14
1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	19
1.4.1. <i>Escalas de evaluación clínica</i>	21
1.5. DIAGNÓSTICO.....	23
1.5.1. <i>Pruebas inmunológicas</i>	23
1.5.2. <i>Estudio electrofisiológico</i>	24
1.5.3. <i>Tests farmacológicos</i>	26
1.5.4. <i>Estudio radiológico</i>	27
1.6. TRATAMIENTO.....	27
1.6.1. <i>Opciones terapéuticas</i>	28
1.6.2. <i>Algoritmo terapéutico en MG anti-RACH</i>	35
1.6.3. <i>Algoritmo terapéutico en MG anti-MuSK</i>	36
1.6.4. <i>Algoritmo terapéutico en MG seronegativa</i>	37
2. HIPÓTESIS	39
3. OBJETIVOS	43
4. RESULTADOS	47
4.1. ARTÍCULO 1.....	49
4.2. ARTÍCULO 2.....	57
5. RESUMEN DE RESULTADOS	67
5.1. ARTÍCULO 1.....	69
5.2. ARTÍCULO 2.....	69
6. DISCUSIÓN	71
6.1. ARTÍCULO 1.....	73
6.1. ARTÍCULO 2.....	75
7. CONCLUSIONES	79
8. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS	83
9. BIBLIOGRAFÍA	87

1



INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN DE MIASTENIA

La Miastenia Gravis (MG) es una enfermedad autoinmune producida por anticuerpos que actúan frente a antígenos post-sinápticos de la unión neuromuscular (UNM). La enfermedad se caracteriza clínicamente por la presencia de fatigabilidad muscular y debilidad ¹⁻³. La MG es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico, inmunológico y terapéutico ⁴.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La MG se considera una enfermedad rara, ya que tiene una prevalencia de 150 casos por millón de habitantes. La incidencia varía entre 1.7 y 21 casos por millón de habitantes y año. Tradicionalmente, la MG se ha considerado una enfermedad que afecta predominantemente a mujeres jóvenes. En un estudio prospectivo realizado en la comarca de Osona (Barcelona) se observaron dos picos de incidencia: en mujeres menores de 40 años (afectando a casi tres veces más mujeres que hombres en este mismo rango de edad), y un segundo pico de incidencia en mayores de 50 años, afectando en mayor medida a hombres (*Figura 1*) ⁵.

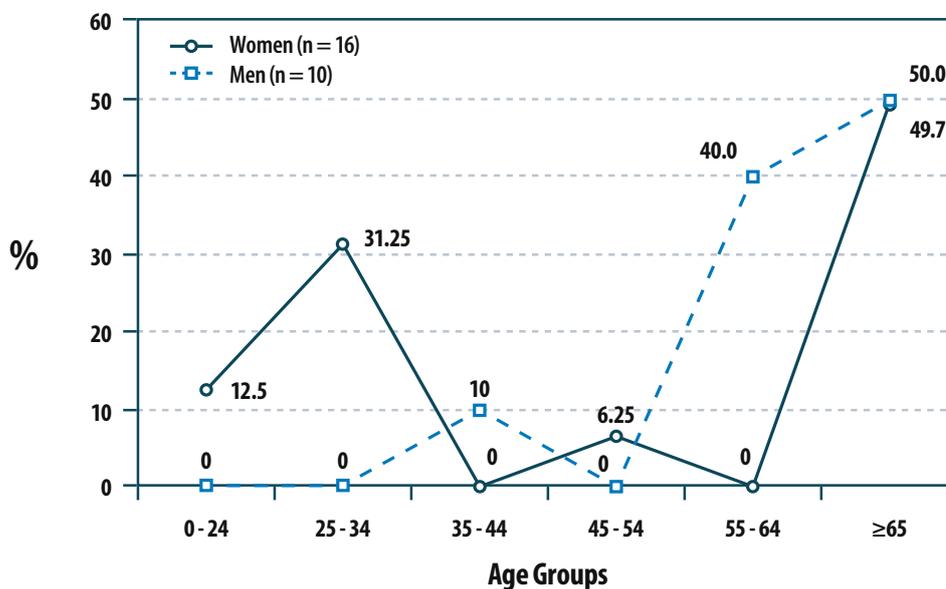


Figura 1: Distribución de los casos nuevos de MG por grupo de edad y sexo.

Aragonès et al, Neurology. 2003 ⁵.

La incidencia de MG en mujeres de 25 a 34 años fue de 27,1 por millón de habitantes y año, y en mujeres de 35 a 44 años fue de 18,4 por millón de habitantes y año. Sin embargo, entre los 65 y 74

años aumentaba a 54,4 en mujeres y 45,9 en hombres por millón de habitantes y año, y aún más a partir de los 75 años, con una incidencia de 180,4 en mujeres y 142 en hombres en el rango de edad de 75 a 84 años, y 228,6 en mujeres y 146,3 en hombres mayores de 85 años (**Figura 2**)⁶. Otros estudios epidemiológicos han confirmado este cambio epidemiológico⁷⁻⁹. Actualmente, los pacientes se clasifican de acuerdo a su edad de presentación en tres grupos: **1)** debut precoz (EOMG – early-onset MG), cuando la enfermedad debuta en menores de 50 años; **2)** debut tardío (LOMG – late-onset MG), cuando aparece en mayores de 50 años; y **3)** debut muy tardío (very late-onset MG), cuando debuta en mayores de 60 años¹⁰.

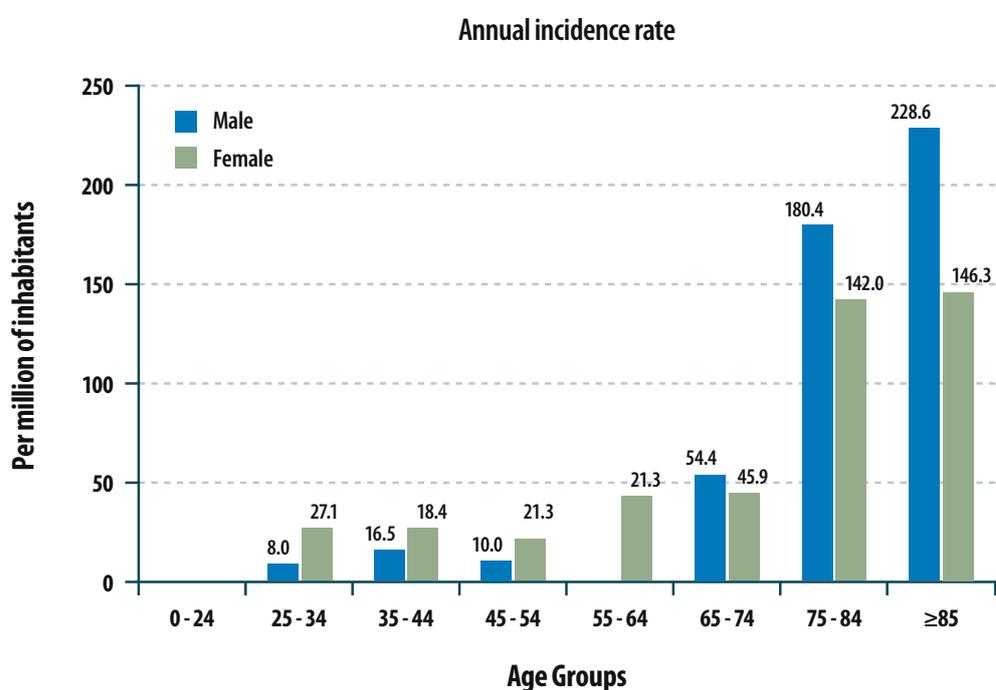


Figura 2: Incidencia anual de MG estratificada por edad y sexo.

Aragonès et al, J Am Geriatr Soc. 2014⁶

Se cree que este aumento en la incidencia en pacientes mayores puede ser consecuencia del envejecimiento de la población y de una mayor conciencia de la enfermedad en este grupo de edad, aunque también se ha sugerido que la senescencia del sistema inmune podría explicar la presencia de más enfermedades autoinmunes en adultos mayores⁵⁻⁶. Es muy importante conocer estos datos epidemiológicos y tener presente la posibilidad del diagnóstico de MG en personas mayores de 65 años, ya que se trata de una enfermedad con buen pronóstico si se diagnostica y se trata adecuadamente¹¹.

1.3. FISIOPATOLOGÍA

1.3.1. La unión neuromuscular

La unión neuromuscular es una sinapsis modificada que se encarga de la transmisión entre el nervio y el músculo, traduciendo los potenciales de acción neuronales en contracción muscular a través de un neurotransmisor: la acetilcolina (ACh). Está formada por tres componentes: **1)** el botón nervioso motor pre-sináptico, donde se sintetiza, acumula en las vesículas sinápticas y libera la ACh; **2)** la hendidura sináptica; y **3)** la membrana muscular post-sináptica, donde se encuentran los receptores de acetilcolina (RACH) (**Figura 3 y 4**)¹².

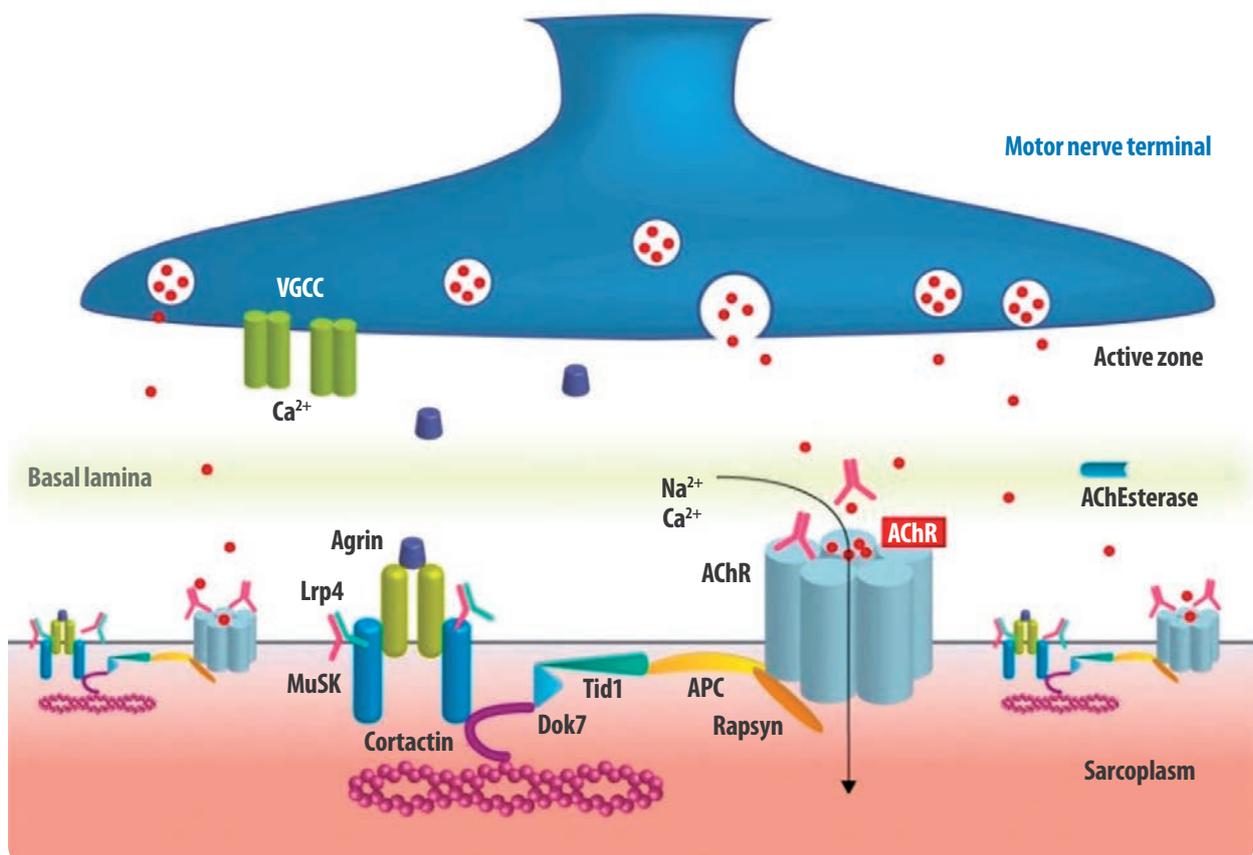


Figura 3: Diagrama de la unión neuromuscular.

© Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

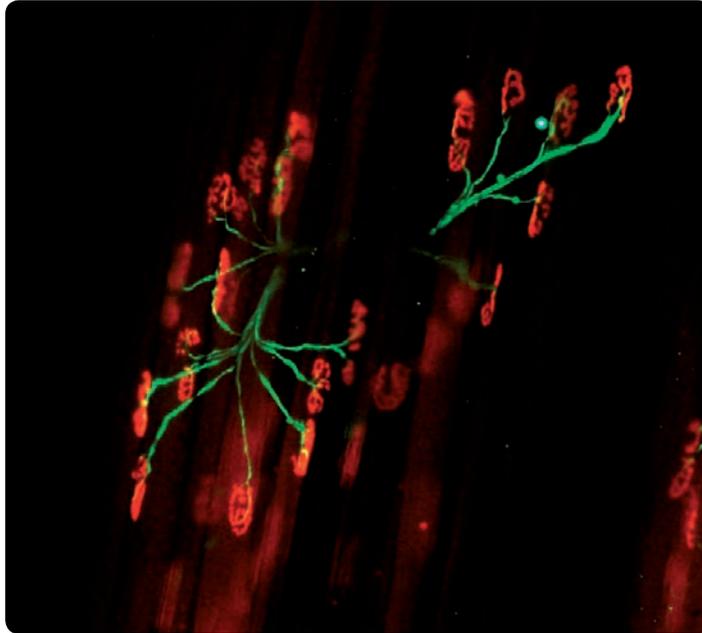


Figura 4: Placas motoras de músculo ocular de rata.
Rojo: α -bungarotoxina. **Verde:** neurofilamento.

Existe una gran densidad de RACH para asegurar una gran eficiencia en la transmisión neuromuscular. La agregación de los RACH requiere la unión de agrina, una proteína derivada de la motoneurona, a LRP4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4) en la membrana post-sináptica. Este complejo agrina-LRP4 activa MuSK (receptor de tirosin-kinasa específico de músculo), y ello conlleva la agregación de RACH mediante la interacción con otras proteínas como Dok7, cortactin o rapsina¹²⁻¹³.

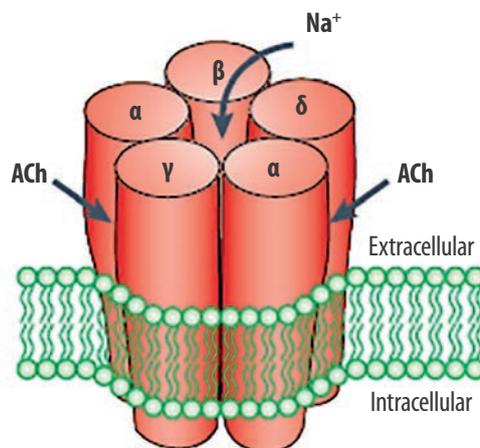


Figura 5: Estructura del receptor de acetilcolina en la membrana post-sináptica.
 Arthur Karlin, Nat Rev Neurosci. 2002¹⁴.

El RACH está formado por 5 subunidades: 2 subunidades α , una subunidad β , una subunidad δ y una subunidad ϵ fetal que posteriormente es sustituida por la subunidad γ en adultos; que forman el canal de sodio en la membrana post-sináptica de la UNM (**Figura 5**)¹⁴.

La transmisión neuromuscular comienza cuando un potencial de acción que recorre el axón de una neurona motora llega al botón pre-sináptico y produce la despolarización de la membrana. Esto estimula que los iones calcio de la hendidura sináptica ingresen al interior del botón sináptico, lo que provoca el acercamiento de las vesículas a la membrana pre-sináptica, su fusión a la misma y la liberación de la ACh por exocitosis a la hendidura sináptica. La ACh difunde por la hendidura sináptica e interacciona con los RACH de la membrana muscular post-sináptica, produciendo una despolarización local, el potencial de placa motora. Cuando la ACh se une a las subunidades α , el canal modifica su conformación y da lugar a su apertura, lo que permite la entrada de iones de sodio generando un potencial de acción que finalmente origina la contracción muscular. La enzima acetilcolinesterasa hidroliza la ACh, y de esta manera finaliza la acción de la ACh en la membrana post-sináptica¹².

1.3.2. Autoanticuerpos

Se han descrito anticuerpos frente a diferentes antígenos de la membrana muscular post-sináptica. Algunos de estos anticuerpos se consideran patogénicos, otros son considerados biomarcadores de la enfermedad dado que no se ha demostrado a día de hoy su papel patogénico.

1.3.2.1. Anticuerpos anti-receptor de acetilcolina

Los anticuerpos anti-RACH están presentes en el 80% de las MG generalizadas y el 50% de las MG con implicación ocular pura¹⁵. El papel patogénico de estos anticuerpos ha sido claramente demostrado, ya que se puede inducir una MG en animales de experimentación por inmunización con RACH o bien por inyección de anti-RACH¹⁶⁻¹⁸.

Los anticuerpos anti-RACH son de la subclase IgG1 e IgG3¹⁹ y actúan mediante tres mecanismos: **1)** activación del complemento, que produce una lesión estructural de la UNM; **2)** cross-linking

(unión del anticuerpo bivalente a dos RACH), que produce la internalización y degradación del RACH; y **3**) bloqueo directo del RACH, que produce una interferencia directa con el canal iónico (**Figura 6**)²⁰⁻²³. El mecanismo más agresivo desde el punto de vista biológico es la activación de complemento.

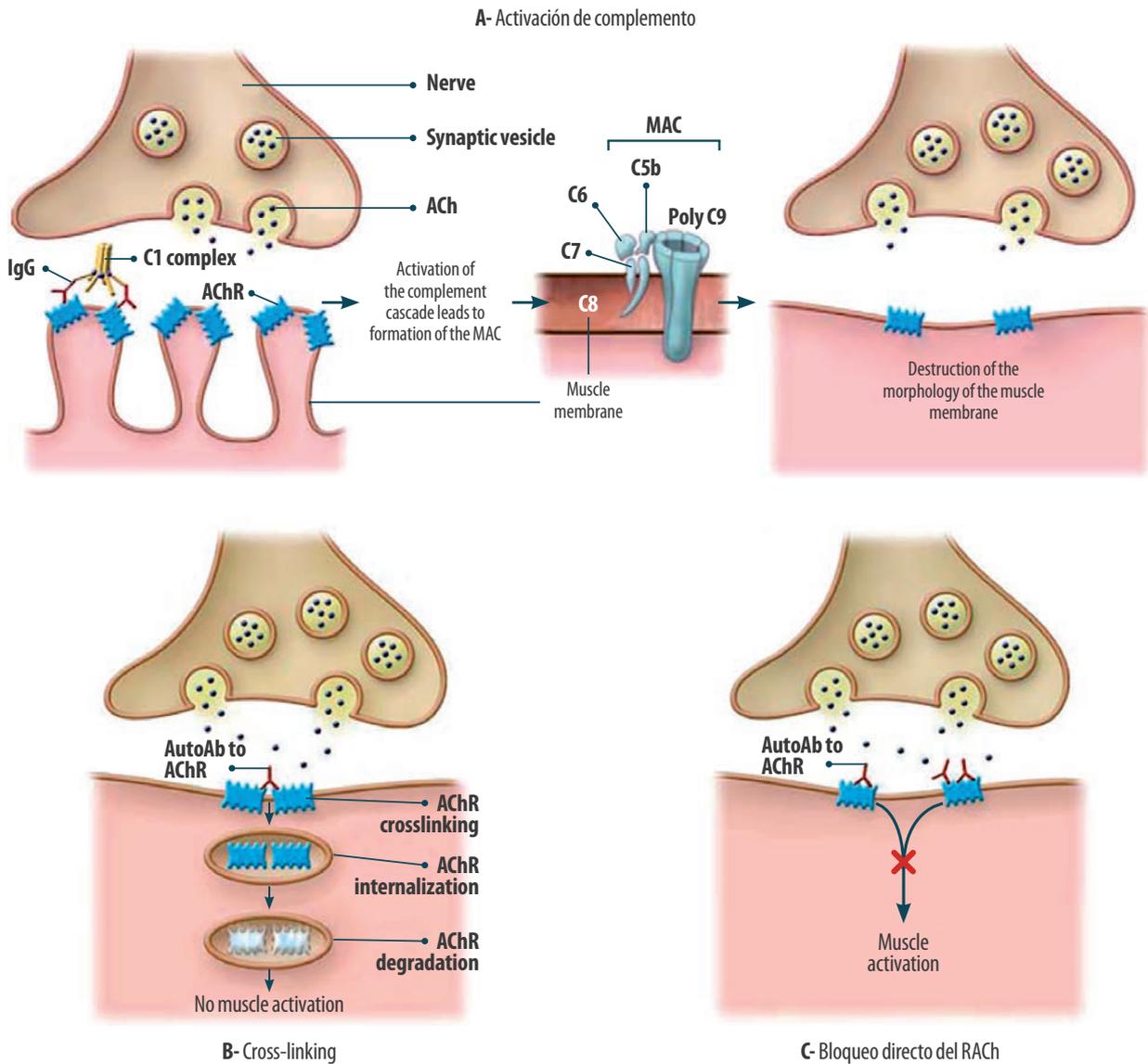


Figura 6: Mecanismos de acción de los anticuerpos anti-RACH.
Conti-Fine et al, J Clin Invest. 2006²³.

Los títulos de anti-RACH no se relacionan con el estado clínico ni con el pronóstico del paciente²⁴. Por este motivo, la detección de los anticuerpos anti-RACH mediante radioinmunoensayo (RIA) se ha convertido en una útil herramienta diagnóstica pero no es útil para el control evolutivo del paciente.

El estudio de las especificidades de los anticuerpos anti-RACH permitió saber que la mayoría de los anticuerpos van dirigidos frente a una región muy concreta de las subunidades, conocida como MIR (región inmunogénica mayor) (**Figura 7**)²⁵.

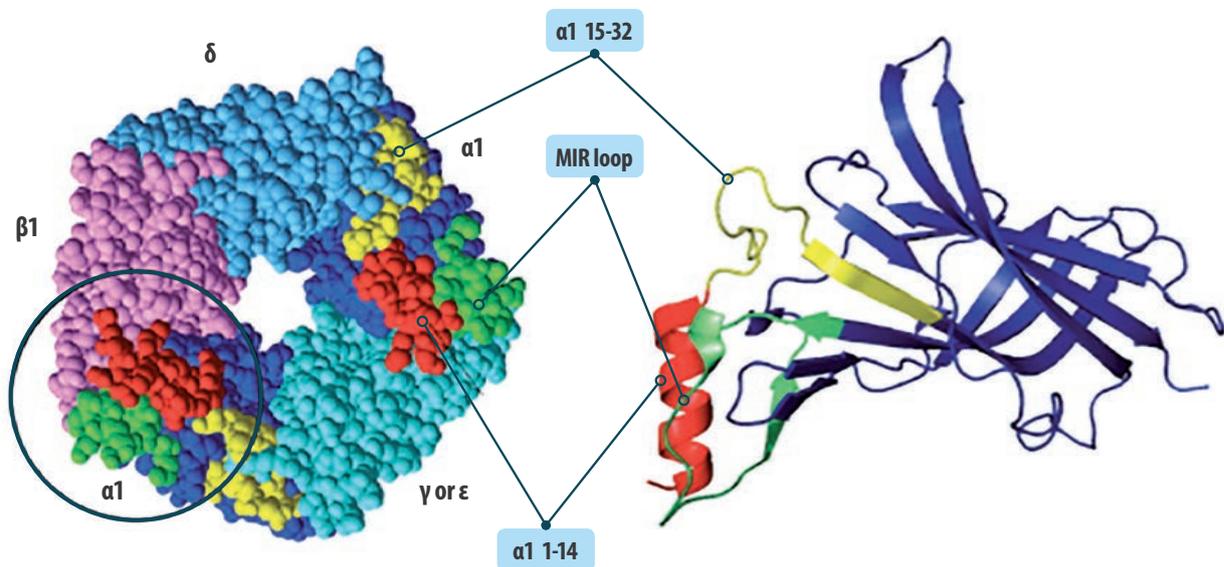


Figura 7: Región inmunogénica mayor (MIR) del RACH.
Luo et al, J Neurosci. 2009²⁵.

1.3.2.2. Anticuerpos anti-MuSK

Los anticuerpos anti-MuSK están presentes en el 5% de las MG generalizadas²⁶. La patogenicidad de estos anticuerpos también ha sido demostrada²⁷⁻²⁸. Son de la subclase IgG4 y ello les confiere unas propiedades diferenciales, ya que no activan complemento²⁹⁻³². Además, los anticuerpos son funcionalmente monovalentes y no pueden producir cross-linking. Los anticuerpos anti-MuSK actúan interfiriendo con las funciones fisiológicas de MuSK, evitando la unión entre MuSK y LRP4, e inhibiendo la fosforilación de MuSK estimulada por agrina. MuSK es un polipéptido transmembrana que actúa manteniendo la integridad funcional de la UNM, por tanto los anti-MuSK acaban alterando los agregados de RACH en la membrana post-sináptica, lo que provoca una reducción del número de RACH funcionantes (**Figura 8**)^{22, 27, 30}.

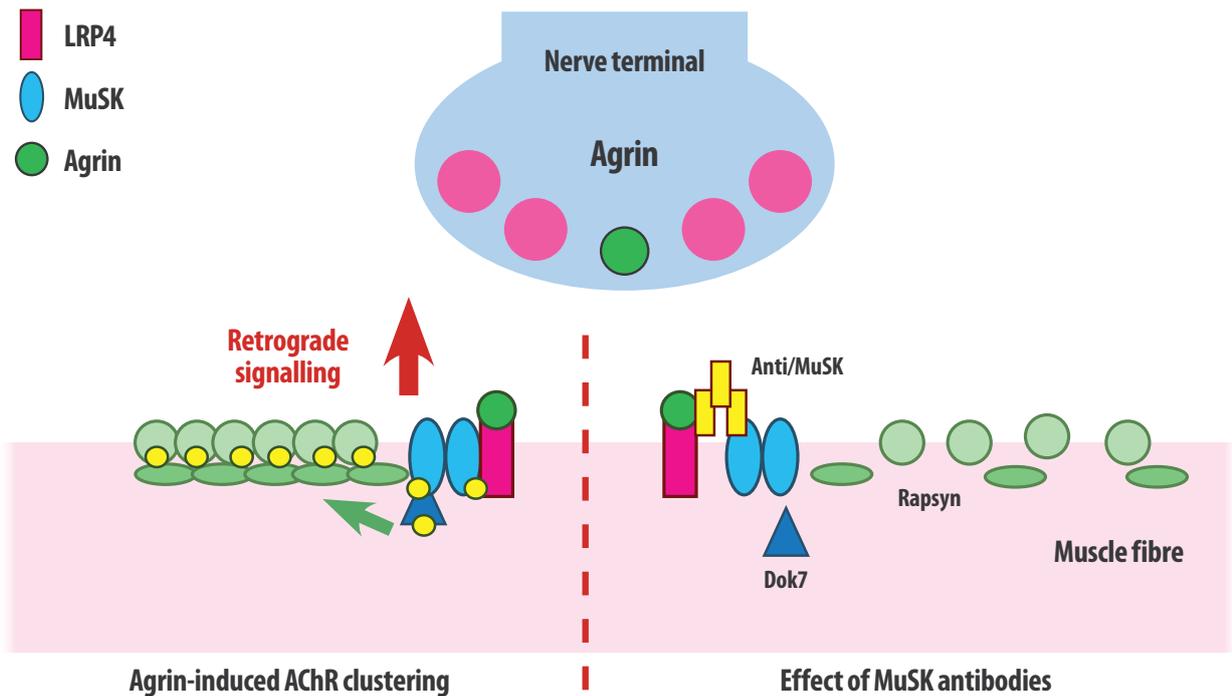


Figura 8: Disrupción de la agrupación del RACH mediada por los anticuerpos anti-MuSK. Phillips et al, F1000Research. 2016²².

En un gran número de casos los títulos de anti-MuSK detectados mediante RIA correlacionan con el status clínico del paciente, por lo que son una buena herramienta diagnóstica y sirven para el control evolutivo de la enfermedad³³.

Se han descrito otras enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos de la subclase IgG4, como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) mediada por anticuerpos frente a contactina-1 o neurofascina-155³⁴⁻³⁵, el pénfigo³⁶, la glomerulonefritis membranosa³⁷ o la encefalitis límbica LGI1³⁸⁻³⁹. Estos trastornos mediados por autoanticuerpos IgG4 parecen compartir similitudes en unión al epítipo, asociaciones con el antígeno leucocitario humano, mecanismo de producción de la enfermedad, etiología subyacente y respuesta a fármacos anti-CD20⁴⁰.

1.3.2.3. MG seronegativa

Aproximadamente el 15% de las MG generalizadas y el 50% de las MG oculares no tienen anticuerpos detectables frente a RACH ni a MuSK⁴¹⁻⁴². Estos pacientes tienen unas

características demográficas y clínicas similares a los pacientes con MG con anticuerpos anti-RACH⁴³⁻⁴⁴. Este grupo se conoce como MG seronegativa o doble seronegativa, y comprende un conjunto heterogéneo de pacientes con anticuerpos frente a diferentes proteínas de la UNM, algunas de ellas conocidas y otras no conocidas a día de hoy.

Anticuerpos anti-LRP4

Los anticuerpos anti-LRP4 se han descrito en un subgrupo de pacientes con MG seronegativa. LRP4 es receptor de la agrina derivada del nervio y activa MuSK para el mantenimiento de la función del RACH (**Figura 9**)⁴⁵. Las series publicadas difieren mucho en cuanto a su frecuencia (2%-27%)⁴⁶⁻⁴⁷, lo que podría deberse al método de detección utilizado, la fuente de LRP4, el estado conformacional del antígeno y/o diferencias técnicas. Estos anticuerpos también pueden coexistir con anti-RACH o anti-MuSK. Se ha descrito un predominio en mujeres y un fenotipo clínico predominantemente ocular o generalizado leve². Los anticuerpos anti-LRP4 se consideran patogénicos ya que la inmunización de ratones con el dominio extracelular de LRP4 desencadena la producción de anticuerpos, así como síntomas y signos electrofisiológicos de MG⁴⁸. Su detección se suele realizar mediante inmunocitoquímica con células HEK293 (human embryonic kidney cells) transfectadas con LRP4 humano⁴⁷.

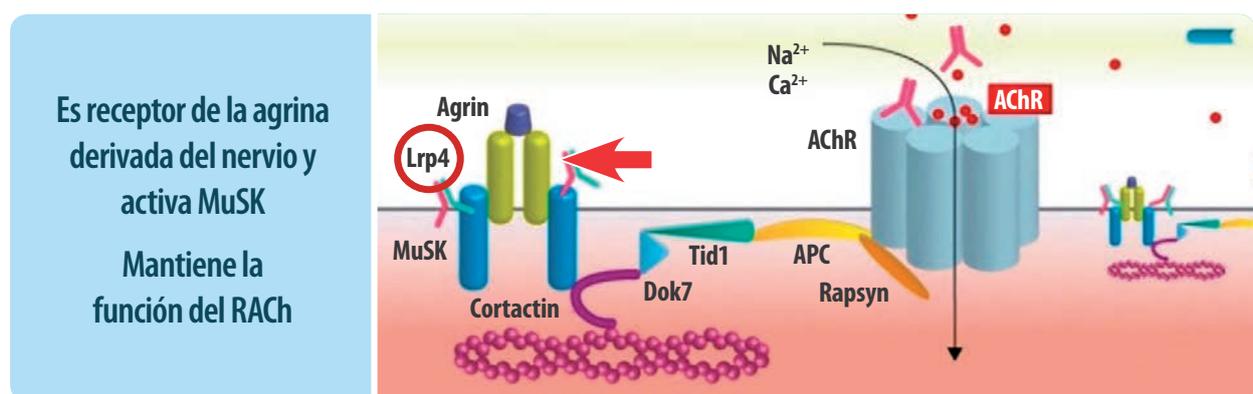


Figura 9: LRP4, localización y función.

Anticuerpos anti-RACH de baja afinidad

Los anticuerpos anti-RACH de baja afinidad son de la subclase IgG1 y pueden encontrarse en el 38% aproximadamente de los pacientes con MG seronegativa⁴⁹⁻⁵⁰. Su detección se realiza mediante un ensayo celular altamente complejo, utilizando células HEK293 cotransfectadas con las cuatro subunidades del RACH y rapsina, para favorecer su agregación en la superficie celular (**Figura 10**)²².

Los autores atribuyen a estos anticuerpos un mecanismo patogénico similar a la MG con anticuerpos anti-RACH, sin embargo estos anticuerpos se dirigen contra la forma adulta del RACH y no a la forma fetal, y en la mayoría de los pacientes con MG anti-RACH los anticuerpos se unen a ambas formas⁴⁹⁻⁵⁰.

Los pacientes con estos anticuerpos suelen tener un debut temprano de la enfermedad y su fenotipo suele ser leve, con frecuencia con implicación ocular exclusiva y con baja frecuencia de generalización, y baja frecuencia de síntomas bulbares (25%)⁵¹.

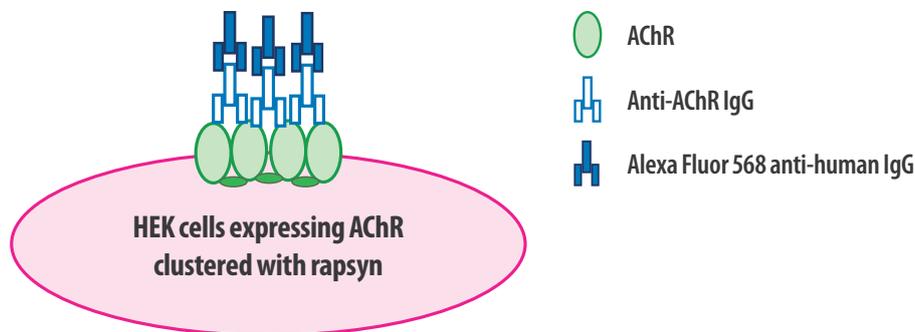


Figura 10: Método de detección de los anticuerpos anti-RACH de baja afinidad. Vincent et al, Ann N Y Acad Sci. 2008⁵².

Anticuerpos anti-Cortactin

Nuestro grupo describió en 2014 un nuevo antígeno en MG seronegativa: cortactin. Este antígeno se encontró usando un array de proteínas humanas (ProtoArray® v5.0 Invitrogen, Carlsbad, California, USA) que contiene más de 9000 proteínas humanas en un estado similar al que se encuentra a nivel celular en cuanto a plegamiento y modificaciones post-traduccionales y, por tanto, permite la detección de estas proteínas a un nivel funcional. Se estudió el suero de pacientes con MG seronegativa que presentaba inmunoreactividad contra la UNM de ratón⁵³. Cortactin se consideró

una buena proteína candidata porque se halla concentrada en la UNM donde actúa downstream en la cascada agrina/LRP4/MuSK, promoviendo la agrupación de los RACH (**Figura 11**)⁵⁴.

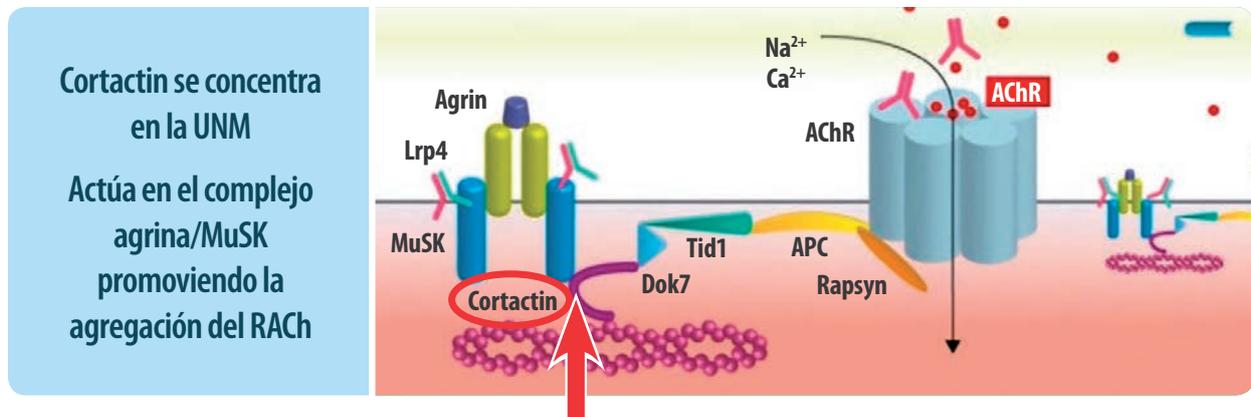


Figura 11: Anticuerpos anti-cortactin, localización y función.

Los anticuerpos se detectaron mediante un ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) in-house y los sueros positivos se comprobaron mediante Western blot. Se estudió el suero de 91 pacientes con MG seronegativa y 103 con MG seropositiva (69 anti-RACH y 34 anti-MuSK). Como controles se incluyeron 30 pacientes con síndrome de Eaton-Lambert (19 positivos para anticuerpos anti-canal de calcio y 11 seronegativos para este anticuerpo), 9 pacientes con otras enfermedades autoinmunes neurológicas (6 CIDP, 3 esclerosis múltiple), 31 pacientes con otras enfermedades autoinmunes (12 lupus, 8 artritis reumatoide, 3 enfermedad mixta del tejido conectivo, 3 polimiositis, 2 síndrome de Raynaud, 1 acrocianosis y 2 esclerodermia), y 19 controles sanos⁵³.

Se encontró que el 19.7% de las MG seronegativas presentaban anticuerpos frente a cortactin, el 4.8% de las MG seropositivas, el 3% de los síndromes de Eaton-Lambert, el 12.5% de pacientes con otras enfermedades autoinmunes y el 5.2% de los controles sanos (**Figura 12**). Por tanto, la presencia de anti-cortactin, aunque no exclusiva, era significativamente mayor en el grupo de MG seronegativa⁵³. Simultáneamente, estos anticuerpos se describieron usando espectrometría de masas en un grupo de pacientes con polimiositis⁵⁵.

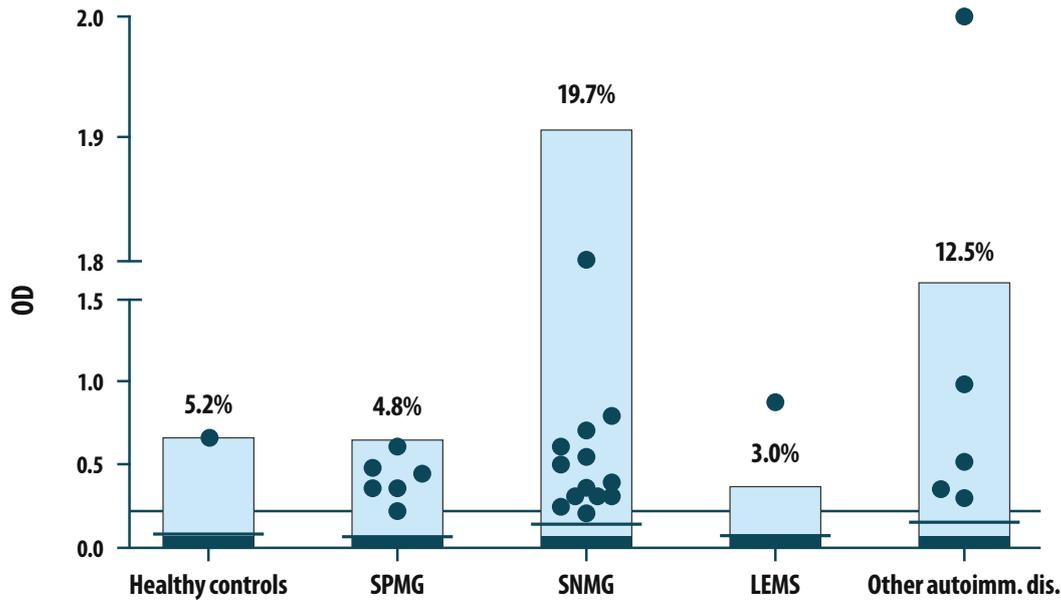


Figura 12: Representación de los anticuerpos anti-cortactin testados con ELISA.

Punto de corte: 0.2 OD. Gallardo et al, Autoimmun Rev. 2014 ⁵³.

Anticuerpos anti-músculo estriado

El suero de algunos pacientes con MG contiene autoanticuerpos que reconocen las estriaciones del músculo esquelético. Estos anticuerpos están dirigidos fundamentalmente contra titina y receptor de rianodina, y están presentes en un subgrupo de pacientes con MG anti-RACH ⁵⁶. No contribuyen a la patogénesis de la enfermedad, pero son considerados biomarcadores de MG asociada a timoma, ya que se encuentran en hasta el 50-70% de estos pacientes ^{2, 57-58}. La presencia de estos anticuerpos se ha asociado con una enfermedad más grave y un peor pronóstico ⁵⁹.

Anticuerpos anti-Agrina

Agrina es una proteína de la matriz extracelular que actúa como ligando de LRP4 activando MuSK, y es esencial para la agregación del RACH. Los anticuerpos anti-agrina se han detectado en un subgrupo de pacientes con MG, siempre en combinación con autoanticuerpos anti-MuSK, anti-LRP4 o anti-RACH. Su patogenicidad y características clínicas están aún por definir ⁶⁰.

1.3.3. Mecanismos etiológicos

La MG es una enfermedad multifactorial debida a la combinación de factores genéticos y ambientales ¹⁰.

1.3.3.1. Susceptibilidad genética

La existencia de varios miembros de una misma familia con MG es infrecuente, y pocos estudios se han centrado en casos familiares o gemelares. Sin embargo, un estudio revisó la literatura disponible y determinó la tasa de concordancia en gemelos monocigóticos. El estudio, que recopiló 31 pares de gemelos monocigóticos, mostró concordancia en el 35% de los casos (11 parejas), mientras que la frecuencia entre gemelos heterocigóticos fue de aproximadamente 4-5%⁶¹. Estos resultados destacan el importante papel del fondo genético en la susceptibilidad a la MG.

La asociación de los genes que codifican el antígeno leucocitario humano (HLA) clase I y clase II con la MG está claramente establecida⁶². La asociación entre el HLA-B8 (MHC clase I) y HLA-DR3 (MHC clase II) y el debut precoz de MG, que se asocia con hiperplasia folicular tímica, se ha confirmado en varios estudios⁶³. El debut tardío está asociado con el HLA-DR2-B7. También se ha observado una asociación con HLA-DR14-DQ5 en pacientes con MG anti-MuSK⁴.

También se han descrito otros genes que confieren susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad, algunos de ellos están también asociados con otras enfermedades autoinmunes. Algunos de estos genes son: PTPN22, CTLA-4, IL-1 β , IL-10, TNF- α e IFN- γ , y están involucrados en la regulación del sistema inmune⁶⁴. Las modificaciones epigenéticas en determinados genes también podrían desempeñar un papel central en la inmunopatogenia de las enfermedades autoinmunes.

1.3.3.2. Factores hormonales

Las hormonas sexuales, principalmente los estrógenos pero también la progesterona y la testosterona, afectan a las células inmunes cuantitativa y cualitativamente⁶⁴. Los estrógenos generalmente favorecen los procesos inmunes que involucran células T helper (Th) 2 CD4+ y células B, promoviendo enfermedades autoinmunes mediadas por células B⁶⁴. Los estrógenos también tienen una gran influencia en el desarrollo y mantenimiento de la función tímica y, por lo tanto, en la generación de linfocitos T CD4 y CD8¹⁰. Se han descrito fluctuaciones en los síntomas de MG durante el embarazo y la menstruación⁶⁵⁻⁶⁶. En conjunto, estos datos sugieren que los estrógenos pueden influir en las respuestas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias, pero se necesitan más datos para confirmar el papel de las hormonas sexuales en la MG.

1.3.3.3. Factores ambientales

Algunos factores ambientales, como fármacos, tóxicos y patógenos, también se han propuesto como factores de riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes. En MG, los principales factores ambientales desencadenantes son: **1)** fármacos, como la D-penicilamina⁶⁷ y los interferones⁶⁸, aunque su posible mecanismo patogénico no está bien establecido; y **2)** infecciones, en concreto el virus Epstein-Barr (VEB), por encontrarse células B con signos de infección por VEB en timos hiperplásicos de pacientes pero no en controles⁶⁹. Otros estudios han postulado la implicación de otros virus como el citomegalovirus o el West-Nile⁷⁰, pero su papel en la patogénesis de la MG es controvertido.

1.3.3.4. Desregulación inmune

Los mecanismos que se han implicado en la producción de anticuerpos en la MG incluyen errores en la presentación de antígenos o reconocimiento, tolerancia hacia los propios antígenos y desregulación de la proliferación/apoptosis de las células inmunes¹⁰.

A pesar de que la producción de anticuerpos **anti-RACH** se atribuye directamente a los **linfocitos B**, existe una amplia evidencia de que los **linfocitos T** tienen un papel clave en la producción de autoanticuerpos en la MG, ya que: **1)** las células T de pacientes con MG responden a la estimulación con RACH y aumentan la producción de anti-RACH *in vitro*; **2)** los linfocitos de sangre periférica de los pacientes incluyen células T y células B específicas para RACH; **3)** Se han aislado líneas o clones de células T reactivos a RACH a partir de sangre periférica, o más eficazmente a partir de timos, de pacientes con MG y se han propagado *in vitro*. Por el contrario, las células T no actúan como células efectoras en la MG. Aunque se han encontrado ocasionalmente algunas células mononucleares en el músculo de los pacientes con MG, estas células están muy dispersas y son monocitos o macrófagos mayoritariamente¹.

El análisis de células T de pacientes con MG ha revelado una sorprendente heterogeneidad en sus patrones de respuesta al antígeno. El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) juega un papel importante, ya que las células presentadoras de antígenos presentan péptidos del RACH

unidos al MHC a los linfocitos Th. Las células de cada paciente responden a múltiples epítomos, y también existen diferencias sustanciales en la respuesta a estos epítomos entre diferentes pacientes. Aunque la mayoría de los sitios de reconocimiento de células T están en la subunidad α , las células T también reconocen epítomos en las otras subunidades ¹.

Las **células T reguladoras (Treg)** también están implicadas en la patogénesis, ya que son necesarias para detectar las células autorreactivas ³. Estas células Treg son CD4 y se encuentran en el timo y en los órganos linfoides periféricos. Se conoce que los Tregs en la MG son funcionalmente defectuosos, pero se desconoce si esta alteración es un factor pre-existente que predispone a la enfermedad, o si bien es consecuencia de la propia inflamación que altera su función ⁷¹⁻⁷².

Algunas de las **citoquinas** secretadas por los linfocitos Th están implicadas en la desregulación inmune de la enfermedad. En concreto, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) se encuentra elevado en el timo, los CD4 y el suero de los pacientes con MG, lo que sugiere la sobreproducción crónica de esta citoquina ⁷³.

La **inmunidad innata** también puede verse implicada en la inducción y perpetuación de la respuesta autoinmune. Se ha demostrado que la expresión de TLR4 (Toll-like receptor 4) se encuentra incrementada en las células epiteliales tímicas de pacientes con MG ⁷⁴, y que los niveles de TLR9 en células mononucleares de sangre periférica se relacionan con la gravedad de la enfermedad ⁷⁵.

En el caso de la **MG anti-MuSK**, se sabe que: **1)** se produce el déficit de tolerancia de las células B mucho antes de la producción de anticuerpos ⁷⁶; **2)** tanto el repertorio de células B naïve como de células B memoria presenta anomalías que no se encuentran en individuos sanos, lo que destaca una desregulación inmune amplia ⁷⁷; **3)** el epítomo al cual se dirigen los anticuerpos es específico y estable durante el curso de la enfermedad en la mayoría de los pacientes ⁷⁸; y **4)** los plasmablastos circulantes contribuyen directamente a la producción de autoanticuerpos anti-MuSK en pacientes que recidivan después del tratamiento con rituximab, que produce la depleción de células B ⁷⁹.

1.3.3.5. Patología tímica

El timo es esencial para la diferenciación de las células T y para el establecimiento de tolerancia central. Las interacciones entre las células del estroma tímico que expresan autoantígenos y los timocitos en desarrollo, conducen a la eliminación de las células T autorreactivas. Las células T tolerantes posteriormente continúan su diferenciación antes de exportarse a la periferia. Las células del estroma tímico incluyen células epiteliales, células mesenquimales y algunas células mioideas. En condiciones fisiológicas, la mayoría de las células tímicas son timocitos y células estromales, y la cantidad de células B es muy pequeña. En un porcentaje importante de pacientes con MG anti-RACH, el timo exhibe cambios estructurales y funcionales¹⁰.

Aunque el papel que juega el timo en la inmunopatogenia de la MG se ha estudiado durante décadas y se cree que las alteraciones tímicas están implicadas en la respuesta autoinmune inicial de la MG, no queda claro cuál es su papel exacto en la inmunopatogénesis de la enfermedad. Estas alteraciones tímicas se han descrito fundamentalmente en los pacientes con MG anti-RACH y algunos seronegativos, no se ha encontrado hiperplasia tímica en los pacientes anti-MuSK⁸⁰.

Timoma

Alrededor del 10-15% de los pacientes con MG presentan un timoma, un tumor epitelial del timo. Estos pacientes suelen tener anticuerpos anti-RACH y la clínica tiende a ser más grave, aunque el pronóstico a largo plazo es similar al resto de pacientes con MG⁸¹. Los timomas se asocian con frecuencia a otros trastornos autoinmunes, probablemente debido a que presentan autoantígenos expresados por las células tumorales y a la desregulación en la selección de linfocitos⁸². Se ha descrito la deficiencia en la expresión del gen regulador AIRE y la pérdida selectiva de células T reguladoras como causa de la selección negativa y la regulación de las células T autorreactivas⁸³.

El timoma debe ser extirpado por completo y debe realizarse un seguimiento clínico y radiológico anual durante al menos 10 años. Algunos pacientes requieren tratamiento adyuvante con radioterapia o quimioterapia siguiendo los criterios de tratamiento actuales en función de la anatomía patológica del tumor. Aunque el timoma sea eliminado, los anticuerpos y los síntomas

de MG suelen persistir y los pacientes suelen requerir tratamiento inmunosupresor crónico para el control de los síntomas de MG⁸².

Hiperplasia tímica

Algunos pacientes, especialmente mujeres con debut temprano de la enfermedad, presentan hiperplasia tímica, que se caracteriza por la presencia de infiltrados linfocitarios y centros germinales similares a los que se encuentran en los nódulos linfáticos. Los timos hiperplásicos contienen células B, T, plasmáticas y células mioides que expresan el RACH. Los timocitos en cultivo generan anticuerpos anti-RACH, y este hecho apoya la idea de una patogénesis intratímica¹⁰.

Timo normal, atrófico o restos tímicos

En algunos casos, especialmente en las MG de debut tardío, se ha observado un timo atrófico, restos tímicos o un timo normal. No queda claro en estos casos cual es el mecanismo que desencadena la enfermedad.

1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La fatigabilidad muscular, es decir, la aparición de debilidad muscular con la fatiga, es la característica clínica fundamental de la MG. Esta fatigabilidad es típicamente fluctuante, empeorando con la actividad física y mejorando con el descanso (**Figura 13**)¹⁻².

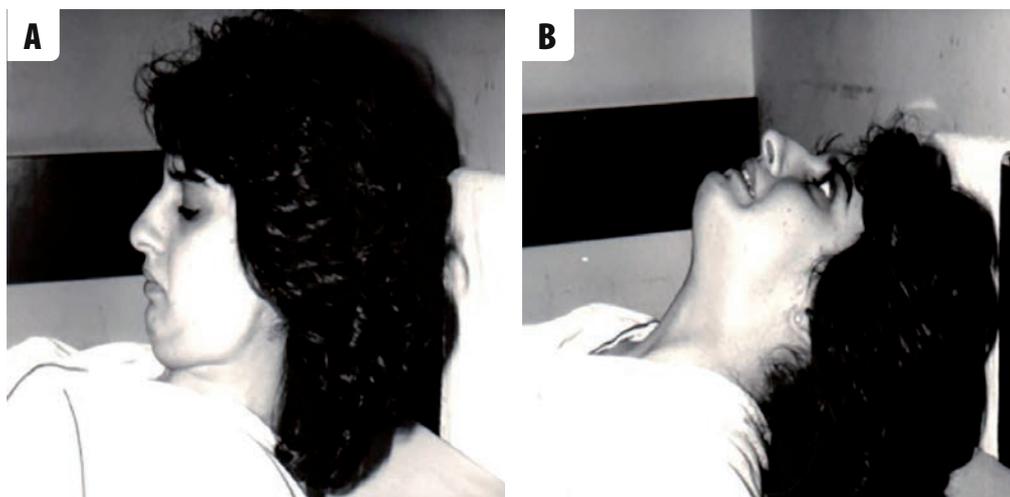


Figura 13: Fatigabilidad cervical: **A)** Flexión cervical normal; **B)** Tras varias flexiones cervicales, la paciente presenta debilidad cervical con utilización de musculatura accesoria.

Los grupos musculares más frecuentemente susceptibles son los músculos oculares, con aparición de ptosis y diplopía (**Figura 14**); músculos faciales, con aparición de debilidad orbicular y facial; músculos bulbares, con aparición de disartria, disfagia, y disnea; y músculos de las extremidades, con aparición de debilidad cervical y en extremidades superiores e inferiores, predominantemente a nivel proximal, aunque también puede afectarse la musculatura distal (**Figura 15**). La implicación de estos músculos puede ser muy variable entre pacientes, incluso en un mismo paciente a lo largo de la enfermedad.



Figura 14: Ptosis y oftalmoparesia fatigable: **A)** Ptosis derecha de inicio; **B)** y **C)** Al mantener la supravversión de la mirada se observa empeoramiento de la ptosis y debilidad del músculo recto inferior izquierdo progresiva.

Cortesía Dr. Carles Roig.



Figura 15: Debilidad:

A) proximal en extremidades superiores; **B)** proximal en extremidades inferiores; **C)** debilidad distal.

La MG con anticuerpos anti-MuSK tienen un fenotipo clínico característico. Estos pacientes presentan una temprana y grave debilidad bulbar y desarrollan con mayor frecuencia crisis respiratorias (**Figura 16**)^{26,84}.

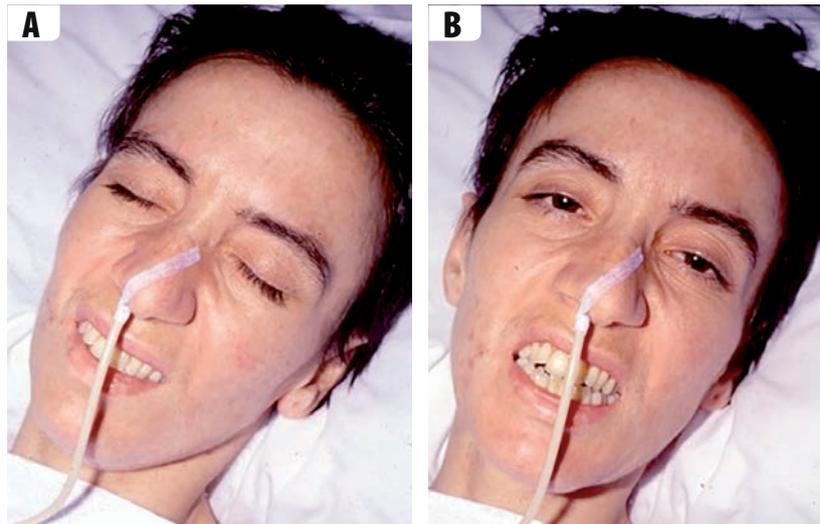


Figura 16: Fenotipo de la MG anti-MuSK: **A)** y **B)** Debilidad facial y bulbar grave.

Los síntomas de MG pueden empeorar en contexto de infecciones, cirugías, fármacos y estrés emocional ¹¹. La remisión espontánea es infrecuente pero se ha descrito en un 10-20% de los casos. La gran mayoría de los pacientes requieren tratamiento inmunosupresor a largo plazo ⁵⁶.

1.4.1. Escalas de evaluación clínica

Las escalas de evaluación clínica son necesarias para estandarizar la forma de valorar la gravedad clínica y la evolución de los pacientes, especialmente en el desarrollo de ensayos clínicos. En el caso de la MG, la heterogeneidad clínica de la enfermedad y la fluctuación de los síntomas en el tiempo, hace que sea complicado reflejar en una única escala el estado global del paciente ⁸⁵.

Aquí solo describiremos la clasificación clínica de la Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) y el estado post-intervención de la MGFA (MGFA-PIS), por haber sido utilizadas en las publicaciones que constituyen esta tesis.

Clasificación clínica de la MGFA

Se trata de una escala clínica que refleja la gravedad clínica y los músculos más afectados en el paciente. Se recomienda registrar los músculos implicados y la máxima gravedad del paciente como punto de referencia.

La escala consta de 5 clases (I-V). La clase I corresponde a los pacientes con clínica ocular exclusiva; las clases II-III-IV corresponden a los pacientes con debilidad generalizada leve, moderada y grave respectivamente; y la clase V corresponde a aquellos pacientes que requieren intubación orotraqueal. Las clases II-III-IV se subdividen a su vez en dos grupos: **A**, cuando la debilidad afecta predominantemente a la musculatura de los miembros y/o axial; y **B**, cuando la debilidad afecta predominantemente a la musculatura bulbar (**Tabla 1**)⁸⁵

Los pacientes clasificados como V se encuentran en crisis miasténica. Los pacientes clasificados como IVB o V se encuentran en situación de riesgo vital¹¹.

Clase I	Debilidad ocular . Puede tener debilidad para la oclusión palpebral. Resto de la fuerza muscular normal.	
Clase II	Debilidad generalizada leve	
	IIA	Predominantemente en miembros y/o axial
	IIB	Predominantemente en musculatura bulbar
Clase III	Debilidad generalizada moderada	
	IIIA	Predominantemente en miembros y/o axial
	IIIB	Predominantemente en musculatura bulbar
Clase IV	Debilidad generalizada grave	
	IVA	Predominantemente en miembros y/o axial
	IVB	Predominantemente en musculatura bulbar. Sonda nasogástrica.
Clase V	Intubación orotraqueal con o sin ventilación mecánica	

Tabla 1: Clasificación clínica de la MGFA.

MGFA-PIS

La clasificación MGFA-PIS está diseñada para evaluar el estado clínico de un paciente en cualquier momento después de instaurar un tratamiento específico (**Tabla 2**). La debilidad orbicular aislada no se considera signo de actividad, pero el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa sí porque se considera que enmascara síntomas de la enfermedad⁸⁵.

Por tanto, las categorías remisión completa estable, remisión farmacológica y manifestaciones mínimas indican un buen control de la enfermedad y son el objetivo a alcanzar cuando se realiza una acción terapéutica.

Remisión completa estable (CSR)	Sin síntomas ni signos de enfermedad durante al menos un año y sin tratamiento
Remisión farmacológica (PR)	Sin síntomas ni signos de enfermedad durante al menos un año con tratamiento (excluyendo piridostigmina)
Manifestaciones mínimas (MM)	Sin síntomas ni limitación funcional pero con signos a la exploración minuciosa
	MM-0 Sin tratamiento durante al menos un año
	MM-1 Inmunosupresores pero no piridostigmina
	MM-2 Solo piridostigmina a dosis bajas (<120mg/día)
MM-3 Inmunosupresores y piridostigmina	
Mejoría (I)	Disminución sustancial de los síntomas o de la medicación pre-tratamiento
Sin cambios (U)	Sin cambios en los síntomas o en la medicación
Empeoramiento (W)	Aumento sustancial de los síntomas o de la medicación
Exacerbación (E)	Alcanza criterios de CRS, PR o MM pero posteriormente desarrolla más síntomas
Fallecimiento por MG (D of MG)	Incluye complicaciones del tratamiento o en los 30 primeros días post-timectomía

Tabla 2: MGFA-PIS.

1.5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de MG se basa en la presencia de síntomas y signos clínicos compatibles. La confirmación del diagnóstico se puede realizar mediante pruebas inmunológicas, electrofisiológicas o bien mediante tests farmacológicos.

1.5.1. Pruebas inmunológicas

Se basa en la determinación de anticuerpos en suero. Los anticuerpos anti-RACH se deben detectar mediante RIA, que determina la cantidad de anticuerpos que inmunoprecipitan RACH de músculo humano solubilizado radiomarcado con α -bungarotoxina I¹²⁵. Mediante este método se puede determinar la presencia del autoanticuerpo así como estimar de forma precisa su título⁸⁶. Existe un kit de ELISA comercial, pero no debe utilizarse para diagnóstico por presentar tanto falsos positivos como falsos negativos.

Los anticuerpos anti-MuSK también deben medirse mediante RIA, utilizando el dominio extracelular completo de MuSK humano radiomarcado con I¹²⁵²⁹.

Los anticuerpos anti-Cortactin se pueden determinar mediante ELISA (OD>0.2) aunque es recomendable confirmar su positividad mediante Western blot⁵³.

1.5.2. Estudio electrofisiológico

El estudio electrofisiológico permite estudiar el funcionamiento de la UNM. Se basa en dos técnicas: la estimulación repetitiva a bajas frecuencias y la electromiografía de fibra aislada. Son técnicas que requieren formación específica para su correcta realización e interpretación.

1.5.2.1. Estimulación repetitiva a bajas frecuencias

Consiste en aplicar un tren de 10 estímulos supramáximos repetidos a bajas frecuencias (2-5 Hz). Normalmente el protocolo incluye explorar un territorio distal (nervio cubital) y un territorio proximal (nervio espinal accesorio), en algunos casos se estudia también el nervio facial. La sensibilidad de la prueba es mayor si se explora un músculo débil. Es muy importante suprimir la administración de piridostigmina al menos durante 12 horas antes de realizarse la prueba.

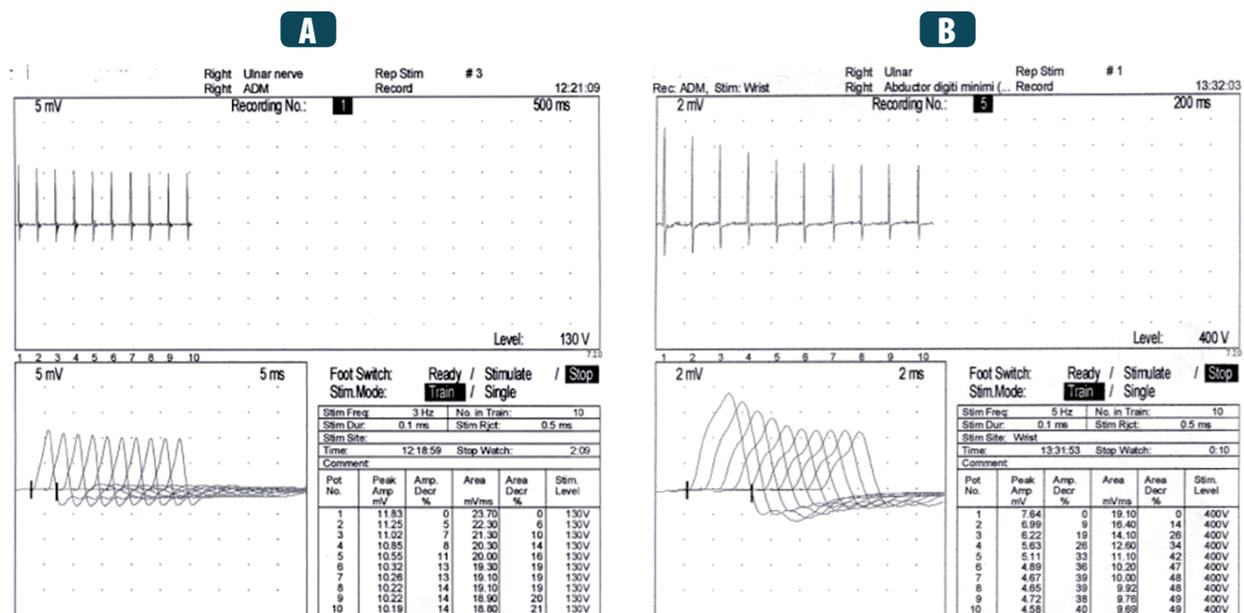


Figura 17: Estimulación repetitiva a bajas frecuencias en nervio cubital:

A) normal y **B)** decremento patológico.

En la MG, la estimulación repetitiva a bajas frecuencias produce una caída en la amplitud mayor del 10% del 4º o 5º potencial de acción muscular compuesto, lo que se conoce como decremento (**Figura 17**). La sensibilidad de la técnica es del 75% en pacientes con MG generalizada y del 50% en pacientes con MG ocular. Esta alteración es específica de trastornos de la UNM pero no de MG, ya que puede encontrarse un decremento patológico en pacientes con Miastenia congénita o Síndrome de Eaton-Lambert⁸⁷.

1.5.2.2. Electromiografía de fibra aislada

Para realizar un estudio electromiográfico de fibra aislada se requiere un electrodo de aguja concéntrica especial, con una superficie de registro muy reducida (25 μm), que permite analizar de forma selectiva el potencial de acción de una única fibra muscular. Cuando se realiza una estimulación mantenida de un nervio motor, la latencia desde el estímulo hasta el potencial de acción motor varía entre descargas. Este intervalo se conoce como jitter y se debe al retraso sináptico en la formación de potenciales de acción entre fibras que dependen de la misma unidad motora (**Figura 18**).

En la MG puede encontrarse un aumento del jitter o bloqueos de conducción, lo que traduce una inestabilidad de la transmisión neuromuscular. El estudio suele realizarse en el músculo frontalis, mediante estimulación voluntaria leve del músculo o estimulación eléctrica con aguja monopolar, y deben estudiarse un mínimo de 20 fibras. Se considera patológico un jitter medio alargado, un jitter individual aumentado en más del 10% de las fibras o la presencia de bloqueos. La fibra aislada es la técnica más sensible para diagnosticar un trastorno de la UNM. Sin embargo, el aumento del jitter no es específico de MG, ya que puede observarse en otras condiciones como las distrofias musculares o procesos que cursan con denervación-reinervación como la esclerosis lateral amiotrófica⁸⁷.

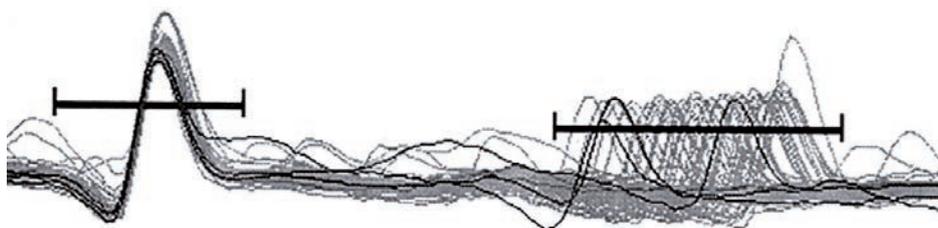


Figura 18: Aumento del jitter en estudio electromiográfico de fibra aislada.

1.5.3. Tests farmacológicos

El *test de Tensilón* consiste en administrar vía endovenosa bromuro de edrofonio, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, y observar si el paciente presenta mejoría clínica. Si esta se produce suele ser inmediata, y su duración varía entre 2-20 minutos (**Figura 19**). Durante la realización del test el paciente debe estar monitorizado dado que pueden aparecer efectos secundarios muscarínicos (bradicardia, hipotensión, broncoespasmo), que pueden ser potencialmente graves⁸⁸⁻⁸⁹.

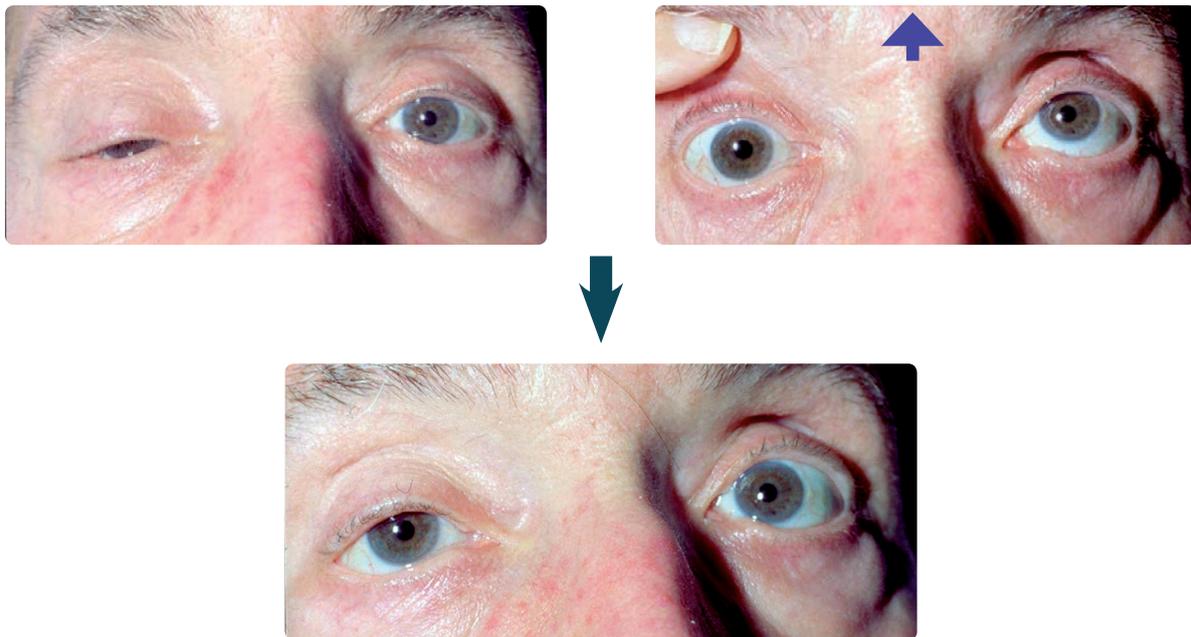


Figura 19: Test de Tensilón. Se observa ptosis derecha y paresia del recto superior derecho. Tras la administración de bromuro de edrofonio, se observa mejoría clínica inmediata.

Cortesía Dr. Carles Roig.

En la práctica clínica habitual es mucho más sencillo administrar 60 mg de piridostigmina y reevaluar al paciente 30 minutos después para observar si existe mejoría clínica (**Figura 20**), ya que no requiere la monitorización del paciente por la escasa frecuencia de efectos secundarios, que cuando ocurren son leves (diarrea, dolor abdominal).

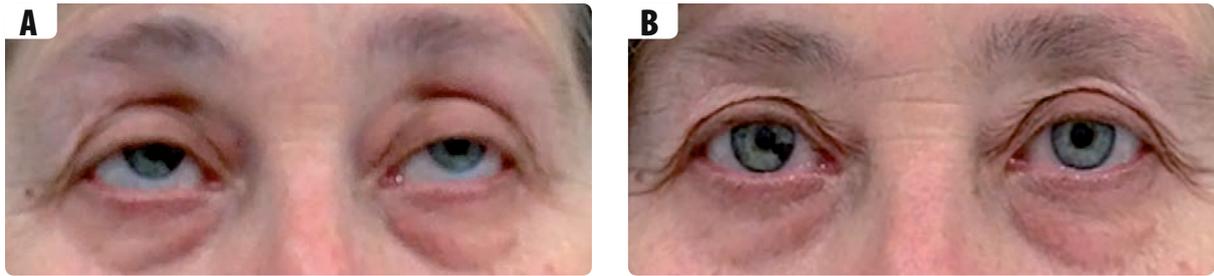


Figura 20: Test de piridostigmina. **A)** Ptosis bilateral en paciente con MG anti-RACH; **B)** 30 minutos después del tratamiento con 60 mg de piridostigmina se observa apertura palpebral normal.

El *test del hielo* es una prueba no farmacológica que resulta útil cuando existe clínica ocular, especialmente ptosis. Consiste en aplicar hielo local durante 2 minutos y observar si existe mejoría clínica (**Figura 21**). Se cree que la sintomatología mejora porque la acetilcolinesterasa se inhibe a una temperatura muscular reducida⁹⁰.

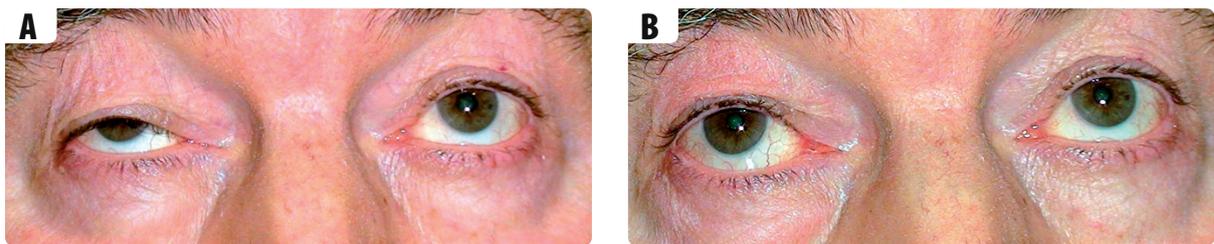


Figura 21: Test del hielo: **A)** Se observa ptosis derecha; **B)** Tras la aplicación de hielo local durante 2 minutos se observa mejoría clínica de la ptosis.

Cortesía Dr. Carles Roig.

1.5.4. Estudio radiológico

Ante la sospecha clínica de MG debe realizarse una tomografía axial computarizada o una resonancia magnética de tórax para determinar la presencia de patología tímica⁸¹.

1.6. TRATAMIENTO

La respuesta al tratamiento en los pacientes con MG es muy variable. En el momento actual, el tratamiento se realiza siguiendo las guías clínicas realizadas por expertos en el tratamiento de la enfermedad⁹¹⁻⁹³. El objetivo del tratamiento es alcanzar un MGFA-PIS de manifestaciones mínimas o mejor, con los mínimos efectos adversos⁹¹.

1.6.1. Opciones terapéuticas

1.6.1.1. Tratamiento sintomático

Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa se utilizan para el tratamiento sintomático de los pacientes con MG. Actúan aumentando la ACh disponible en la UNM, de manera que facilitan su unión al RCh. La piridostigmina es el más utilizado, y su dosis depende en gran medida de los síntomas del paciente, de la actividad diaria que realice, de la respuesta al fármaco y de la presencia de efectos secundarios (dolor abdominal y/o diarrea), que son muy variables entre pacientes. En un porcentaje elevado de casos, el tratamiento con piridostigmina únicamente no controla por completo los síntomas de la enfermedad, pero en algunos casos puede ser suficiente. El efecto beneficioso de la piridostigmina en los pacientes con MG anti-MuSK es limitado⁹¹⁻⁹².

3,4 - Diaminopiridina

La 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) mejora la transmisión neuromuscular al aumentar la liberación cuántica de ACh inhibiendo canales de potasio regulados por voltaje y activando canales de calcio dependientes de voltaje. Es un tratamiento ampliamente utilizado en el tratamiento sintomático del síndrome de Eaton-Lambert y en algunos subtipos de Miastenia congénita. Recientemente se ha descrito el caso de un paciente con MG anti-MuSK con escasa respuesta a piridostigmina que presentó una respuesta clínica favorable y una buena tolerancia a 3,4-DAP. Aunque se trata de la observación clínica de un único paciente no comparado con controles, el caso proporciona evidencia de que 3,4-DAP puede ser efectivo como tratamiento sintomático en MG anti-MuSK⁹⁴.

1.6.1.2. Timectomía

La realización de timectomía en MG se basó inicialmente en la observación de que los pacientes con MG y timoma mejoraban clínicamente tras la extirpación quirúrgica del timo. A raíz de esta observación, durante varias décadas se empleó la timectomía empíricamente como tratamiento en pacientes con MG no asociada a timoma. Posteriormente, la realización de timectomía se relegó a un segundo plano en muchos centros debido a la aparición de otras opciones terapéuticas (inmunosupresores

e inmunomoduladores) y a la reticencia de los pacientes a la cirugía por el riesgo quirúrgico y el post-operatorio doloroso tras una esternotomía.

Hasta hace poco existían discrepancias en cuanto al beneficio de la timectomía en MG no asociada a timoma entre los expertos en MG. En 2016 se publicó un ensayo clínico multicéntrico, internacional, prospectivo, enmascarado y randomizado sobre timectomía en MG anti-RACH no asociada a timoma. El estudio concluyó que los pacientes timectomizados presentan mayor mejoría clínica, requieren menor dosis de prednisona y presentan menor número de recidivas en un periodo de seguimiento de 3 años, comparado con los pacientes no timectomizados (**Figura 22**)⁹⁵.

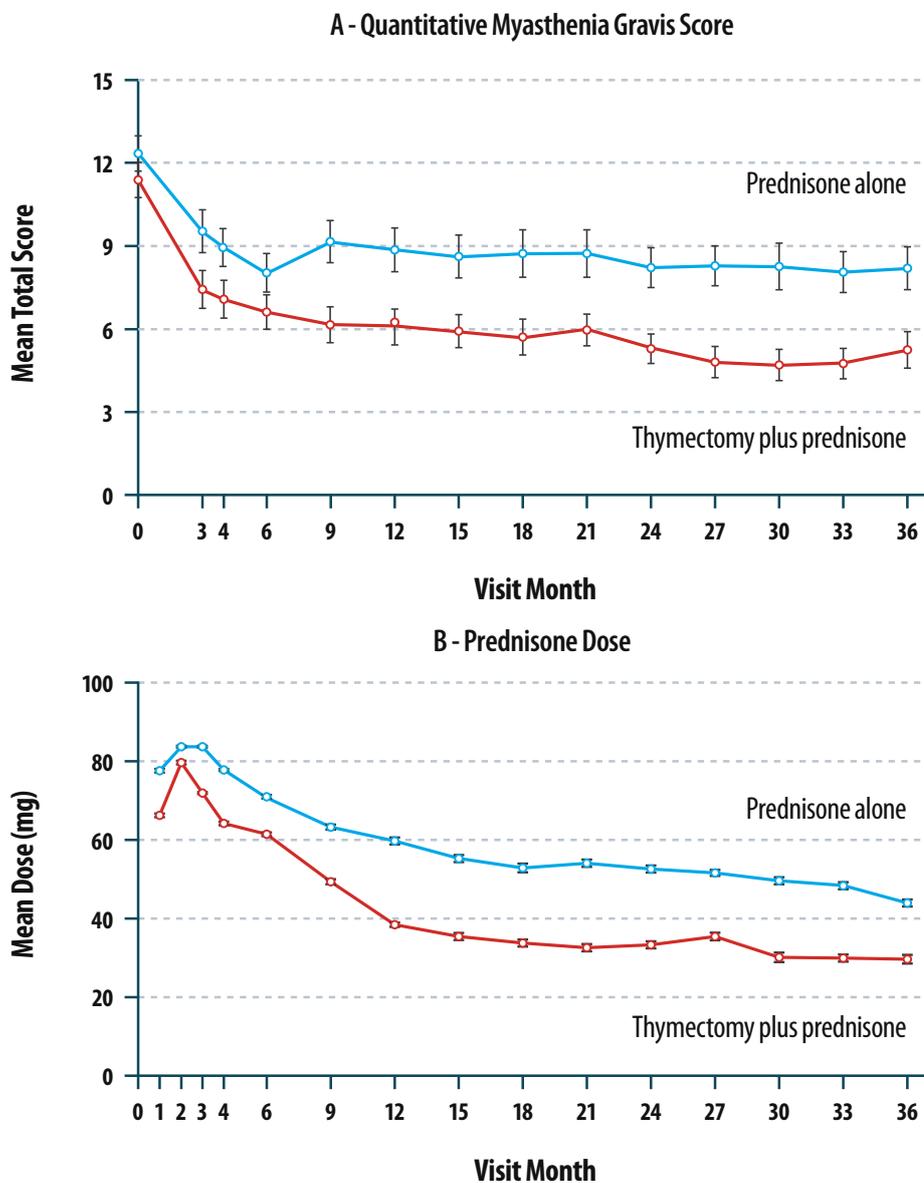


Figura 22: A) Quantitative Myasthenia Gravis score (QMg);
y **B)** Dosis de prednisona, por grupo de tratamiento.

Además, en el momento actual la timectomía se realiza por toracoscopia (VATS - video-assisted thoracoscopic surgery), método que garantiza la extirpación completa del timo con bajísima morbi-mortalidad peri-quirúrgica y una recuperación rápida y poco dolorosa⁹⁶. Por tanto, actualmente se recomienda la realización de timectomía: **1)** pacientes con MG asociada a timoma⁸¹; y **2)** pacientes con MG anti-RACH no asociada a timoma menores de 65 años⁹⁵.

1.6.1.3. Tratamiento inmunomodulador

Las inmunoglobulinas y el recambio plasmático son tratamientos con efecto rápido pero poco duradero. Por este motivo, se utilizan como tratamiento en las exacerbaciones o en situaciones de riesgo vital en las que se requiere una respuesta clínica rápida. En algunas ocasiones, principalmente en pacientes fármacorresistentes, se pueden utilizar como tratamiento periódico de mantenimiento⁹¹⁻⁹². Ensayos randomizados y controlados han demostrado una eficacia similar entre ambos tratamientos⁹⁷.

Inmunoglobulina endovenosa o subcutánea

La inmunoglobulina endovenosa (IGEV) suele ser el tratamiento inicial en caso de exacerbación clínica. El tratamiento se suele administrar a dosis de 2 g/Kg repartido en 3 o 5 días, y requiere administración hospitalaria, bien en sala de hospitalización o en hospital de día. El mecanismo por el cual las IGEV producen la mejoría de los síntomas en MG se desconoce, aunque se hipotetiza que sus dos funciones principales son la competición con los autoanticuerpos y la unión al receptor Fc. Las IGEV producen mejoría clínica de forma rápida (< 15 días) y su efecto suele durar aproximadamente 2 meses. Su efecto secundario más común es la cefalea, otros efectos secundarios más graves son poco frecuentes. Los pacientes MuSK no suelen presentar una respuesta favorable al tratamiento con IGEV⁹⁸.

En algunos casos los pacientes requieren la administración de IGEV de forma periódica como tratamiento de mantenimiento. En estos casos una opción novedosa y útil es la administración del tratamiento vía subcutánea (IGSC). La IGSC puede autoadministrarse en domicilio, lo que la convierte en un tratamiento cómodo y práctico. Estudios recientes confirman su equivalencia en cuanto a resultados clínicos y demuestran un alto grado de satisfacción por los pacientes⁹⁹.

Recambio plasmático

El recambio plasmático suele utilizarse en casos de exacerbación clínica, principalmente en pacientes con MG anti-RACH o seronegativa sin respuesta a IGEV, o como primera opción en pacientes MuSK. El recambio plasmático reduce temporalmente la concentración de anticuerpos circulantes y produce mejoría clínica en cuestión de días en la mayoría de los pacientes. Se suelen realizar recambios a días alternos hasta 5-7 veces habitualmente, aunque hay pacientes que requieren un mayor número. Los efectos secundarios más frecuentes suelen ser hipotensión y parestesias por hipocalcemia inducida por citrato. Además pueden alterar los factores de la coagulación, por lo que requieren controles analíticos frecuentes⁹⁷.

1.6.1.4. Tratamiento inmunosupresor

Prednisona

Fue el primer inmunosupresor utilizado en MG y sigue siendo el primer fármaco utilizado cuando los inhibidores de la acetilcolinesterasa no son capaces de controlar los síntomas de la enfermedad. Se suelen iniciar a dosis de 1mg/Kg/día y, una vez conseguida la mejoría clínica (normalmente en 1-3 meses), se reduce su dosis de forma progresiva. Se suele mantener a dosis bajas y administrar a días alternos como tratamiento de mantenimiento durante años. Algunos pacientes pueden experimentar un empeoramiento clínico transitorio en los primeros 7-10 días tras iniciar la prednisona a dosis altas, por lo que es recomendable ingresar al paciente cuando se inicia el tratamiento. Varios estudios retrospectivos sobre el tratamiento corticoideo en MG demuestran que más del 73% de los pacientes alcanzaron mejoría importante o remisión clínica. Los corticoides pueden tener efectos adversos si su uso es crónico y a dosis altas (hipertensión, intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus, osteoporosis, cataratas, glaucoma, úlcera péptica, retención de sodio y líquidos, obesidad, pérdida de potasio, ansiedad o psicosis)¹⁰⁰⁻¹⁰².

Azatioprina

La azatioprina es un antimetabolito de las purinas que interfiere con la proliferación de las células T y B. La azatioprina se puede usar en monoterapia o bien combinada con prednisona, como adyuvante o ahorrador de dosis de corticoides. El tratamiento suele ser efectivo, estudios

retrospectivos han indicado que el 70-90% de los pacientes presentan mejoría, pero su efecto tarda 9-12 meses en aparecer¹⁰³⁻¹⁰⁴. La dosis terapéutica habitual es de 100-150 mg al día, y se calcula para cada paciente por peso y determinación de la enzima Tiopurinametiltransferasa (TPMT). Los efectos adversos del tratamiento están en relación con la actividad de esta enzima, ya que interviene en el metabolismo de la azatioprina. Los efectos adversos potencialmente más graves son la hepatotoxicidad y la mielodepresión, aunque son reversibles si se detectan precozmente y se retira el tratamiento, por lo que es recomendable seguimiento analítico periódico¹⁰⁵.

Micofenolato mofetil

El micofenolato mofetil bloquea selectivamente la síntesis de las purinas, suprimiendo por tanto la proliferación de las células B y T. El micofenolato mofetil se suele usar como adyuvante o ahorrador de dosis de prednisona. El beneficio clínico de este fármaco se ha sugerido en series de casos y estudios retrospectivos¹⁰⁶⁻¹⁰⁷, y se utiliza en la práctica diaria a dosis de 1-3 g al día. Sin embargo, dos estudios controlados no han demostrado mayor beneficio de este fármaco comparado con prednisona 20 mg al día¹⁰⁸⁻¹⁰⁹. Estos resultados negativos se deben probablemente a la corta duración del estudio, ya que el micofenolato mofetil requiere aproximadamente 6 meses para poder observar su efecto beneficioso.

Ciclosporina

La ciclosporina inhibe la proliferación de las células T mediante la interrupción de la señalización de calcineurina, bloqueando la síntesis de interleuquina-2 y otras proteínas esenciales para la función de las células T CD4. Un ensayo clínico randomizado y controlado¹¹⁰⁻¹¹¹, así como estudios retrospectivos¹¹², han demostrado la eficacia de este fármaco en MG como fármaco ahorrador de corticoides. La ciclosporina se administra a dosis de 4mg/Kg/día aproximadamente, ajustando según niveles plasmáticos. Su efecto es rápido, puede ser observado en 1-3 meses de tratamiento, y por este motivo se utiliza también como segundo fármaco en pacientes resistentes a prednisona con formas graves de la enfermedad. Los efectos secundarios más frecuentes son hirsutismo, hiperplasia gingival, hipertensión y nefrotoxicidad.

Rituximab

El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el marcador de superficie CD20 de las células B. El fármaco produce la reducción de células B circulantes y fue inicialmente utilizado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin de células B¹¹³⁻¹¹⁴. Posteriormente emergió como una herramienta terapéutica útil para el manejo de enfermedades autoinmunes¹¹⁵⁻¹¹⁶.

Las células B autorreactivas tienen un claro papel patogénico en el desarrollo de la MG, y por este motivo el rituximab se ha usado en pacientes con MG fármacorresistente. El rituximab ha demostrado ser efectivo en MG anti-RACH y anti-MuSK, aunque su beneficio clínico es mayor y más prolongado en pacientes MG anti-MuSK (**Figura 23**)^{33, 117-120}.

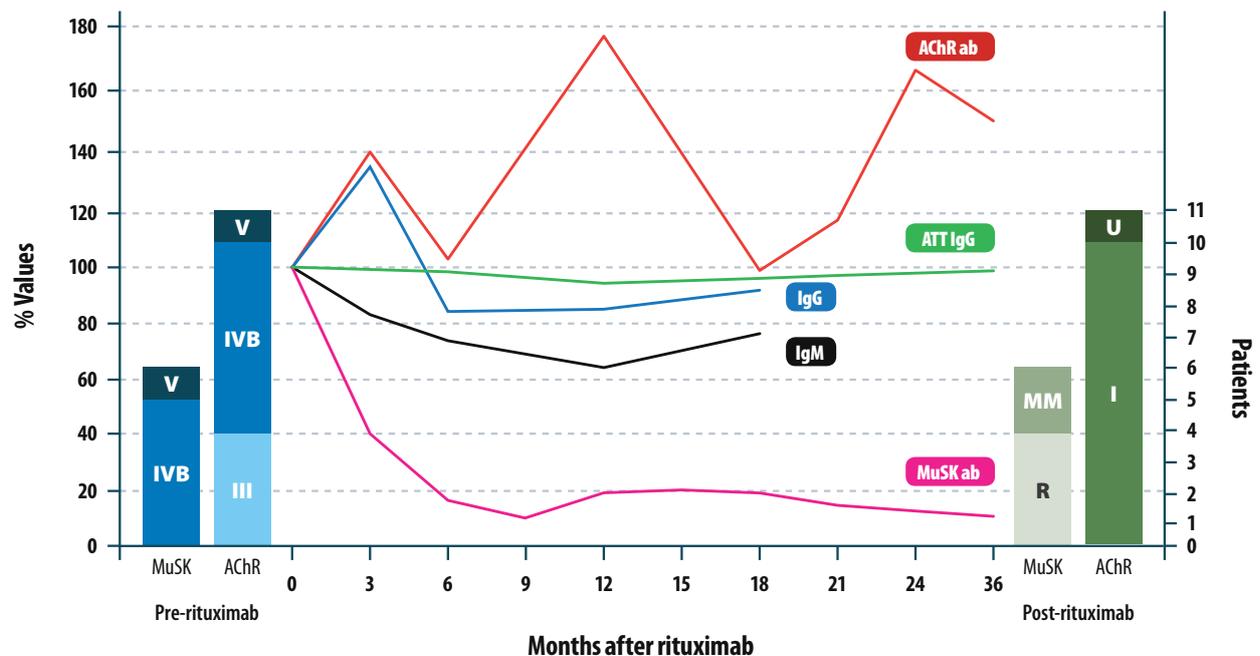


Figura 23: MGFA antes del tratamiento con rituximab y MGFA-PIS representados en gráfico de barras para MG anti-MuSK y MG anti-RACH. Títulos de anticuerpos anti-AChR y anti-MuSK, IgG total, IgM e IgG específica del toxoide antitetánico (ATT) expresadas como porcentaje de disminución o incremento representados en gráfico de líneas.

Díaz-Manera et al, Neurology. 2012³³.

De hecho, el rituximab también ha demostrado ser un fármaco notablemente efectivo en otras enfermedades mediadas por IgG4 del sistema nervioso central y periférico¹²¹, y el tejido conectivo de la piel¹²² o los riñones¹²³. Esta excelente respuesta al rituximab de las enfermedades mediadas

por anticuerpos de la subclase IgG4 es un dato más a favor de que comparten un mecanismo patogénico común: la interferencia mecánica de las interacciones extracelulares ligando-receptor por estos anticuerpos⁴⁰.

Los protocolos de infusión de rituximab en enfermedades autoinmunes difieren mucho entre centros. El régimen habitualmente utilizado en nuestro centro se basa en 6 administraciones del fármaco vía endovenosa, a dosis de 375mg/m² de superficie corporal, administradas semanalmente las 4 primeras dosis y mensualmente las dos restantes. Habitualmente se administra pre-medicación con antihistamínicos, corticoides y analgesia para reducir al máximo la posibilidad de una reacción alérgica.

Los pacientes suelen tolerar adecuadamente el fármaco. Sin embargo, se han descrito algunos efectos adversos potencialmente graves. La leucoencefalopatía multifocal progresiva, producida por la infección del virus JC, es un efecto secundario grave y potencialmente mortal del rituximab, aunque en MG únicamente se ha reportado un caso¹²⁴. El síndrome de lisis tumoral es un posible efecto secundario del fármaco en el tratamiento del linfoma no Hodgkin de células B, que nunca se ha descrito en MG. Es conveniente realizar un estudio serológico de hepatitis B antes de la administración del fármaco, ya que podría darse la reactivación del virus¹²⁵. También es necesario un estudio quantiferon de tuberculosis, ya que el paciente debería recibir tratamiento específico en caso de ser positivo.

Tacrolimus

El tacrolimus tiene un mecanismo de actuación similar a la ciclosporina. Su efecto beneficioso en pacientes con MG se ha reportado en diversos estudios¹²⁶, incluido un ensayo randomizado no enmascarado en 36 pacientes con MG de debut¹²⁷. Se le considera útil como ahorrador de corticoides¹²⁸, pero su efecto beneficioso no ha demostrado ser superior a prednisona. La dosis habitual es de 3-5 mg al día, aunque también debe ajustarse según niveles plasmáticos. Los efectos secundarios más relevantes de este fármaco son hipertensión, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, diabetes mellitus, hipercolesterolemia e infecciones oportunistas.

Ciclofosfamida

La ciclofosfamida es un agente antiproliferativo no específico del ciclo celular que, tras su biotransformación hepática a metabolitos activos, ejerce su acción citotóxica principalmente mediante enlaces cruzados covalentes de ácidos nucleicos, lo que da como resultado una replicación no emparejada de ADN y el daño en la estructura del ADN. En un ensayo randomizado y controlado, la administración de bolus intravenosos de ciclofosfamida (500 mg/m² superficie corporal) en pacientes con MG fármacorresistente, demostró una mejoría de la fuerza muscular y disminución del requerimiento de cortisona ¹²⁹. También se ha observado respuesta favorable en pacientes tratados con dosis altas (50 mg/Kg/día) de ciclofosfamida durante 4 días seguida de terapia de rescate, con un efecto beneficioso sostenido durante varios años sin recaídas clínicas ¹³⁰. Sin embargo, el fármaco tiene efectos secundarios frecuentes e importantes: mielosupresión, cistitis hemorrágica y aumento del riesgo de infecciones y cáncer.

1.6.2. Algoritmo terapéutico en MG anti-RACH

La piridostigmina suele ser el primer fármaco utilizado ante la sospecha de MG. En algunos casos puede administrarse como tratamiento único si produce un buen control de los síntomas, pero en la mayoría de los pacientes se utiliza como tratamiento sintomático adyuvante.

Si el paciente presenta un timoma o en pacientes menores de 65 años sin timoma, se realiza la extirpación quirúrgica del timo.

El fármaco utilizado como tratamiento inmunosupresor de base en MG anti-RACH es la prednisona. En casos de resistencia a la prednisona, efectos secundarios/intolerancia, o dependencia a dosis altas de prednisona (> 40 mg a días alternos) se suma un segundo inmunosupresor. Por un perfil de efectos adversos más favorable y habitual buena tolerancia, el segundo fármaco suele ser la azatioprina. Si el paciente presenta un TPMT bajo y no puede tomar este tratamiento o bien no presenta una respuesta favorable, se opta por micofenolato mofetil. En casos de resistencia a los tratamientos previos, o necesidad de una respuesta rápida por el estado de gravedad del paciente, se suele optar por ciclosporina.

En casos de fármacorresistencia, existen diferentes opciones terapéuticas: rituximab, tacrolimus o ciclofosfamida. Habitualmente se prefiere como primera opción el rituximab, ya que tiene un perfil de efectos adversos mejor y suele ser un fármaco bien tolerado. La farmacorresistencia se define como la falta de respuesta a prednisona y otros dos fármacos inmunosupresores convencionales.

En casos de debilidad grave o exacerbación, tanto las IGEV como el recambio plasmático han mostrado eficacia similar. En pacientes fármacorresistentes, se puede administrar IGEV/IGSC o realizarse recambio plasmático de forma periódica como tratamiento de mantenimiento (**Figura 24**)⁹¹⁻⁹².

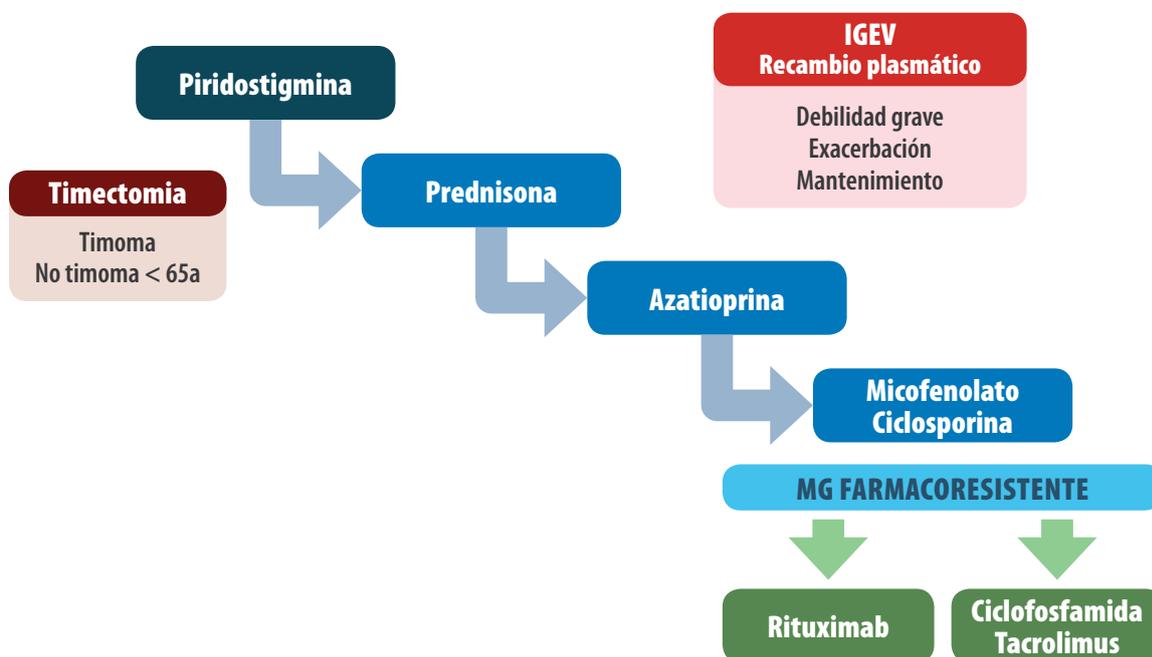


Figura 24: Algoritmo terapéutico en MG anti-RCh.

1.6.3. Algoritmo terapéutico en MG anti-MuSK

Según nuestra serie clínica, alrededor de un 40% de pacientes con MG anti-MuSK presenta una excelente respuesta a prednisona. Si el paciente presenta resistencia a este inmunosupresor, y en base a la evidencia científica actual^{33, 118-119}, la recomendación es realizar tratamiento con rituximab. En caso de inicio o exacerbación grave, el recambio plasmático suele dar mejores resultados que las IGEV. Dado que la piridostigmina no suele ser eficaz, se puede plantear tratamiento sintomático con 3,4-DAP (**Figura 25**)⁹⁴.

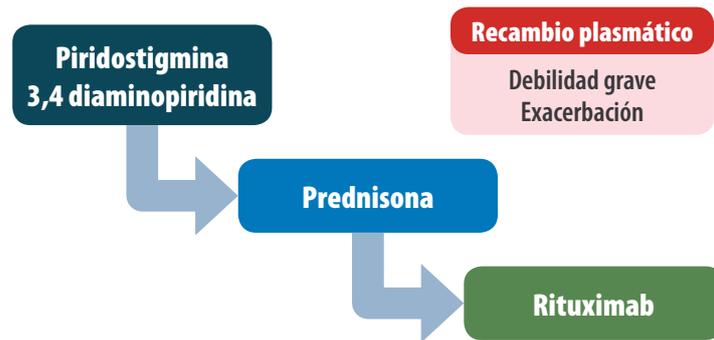


Figura 25: Algoritmo terapéutico en MG anti-MuSK.

1.6.4. Algoritmo terapéutico en MG seronegativa

El algoritmo terapéutico en MG seronegativa es superponible al de la MG anti-RACH (*Figura 24*)⁹¹⁻⁹². En el caso de la MG seronegativa no se realiza timectomía si no existe evidencia de timoma, hecho que es excepcional.

2

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS 1

Los anticuerpos anti-cortactin son un biomarcador en MG seronegativa y los pacientes que los presentan muestran un fenotipo clínico determinado.

HIPÓTESIS 2

Rituximab es eficaz para el tratamiento de la MG anti-MuSK fármacorresistente y su posología determina la frecuencia de recaídas y duración del efecto beneficioso.

3



OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

- ▶ Describir nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos en Miastenia Gravis.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- ▶ Detectar la presencia de anticuerpos anti-cortactin mediante ELISA y Western blot en el suero obtenido en el momento del diagnóstico de nuestra serie de pacientes con diagnóstico definitivo de MG y en controles sanos y evaluar su frecuencia.
- ▶ Describir el fenotipo clínico de los pacientes con anticuerpos anti-cortactin.
- ▶ Describir la respuesta al tratamiento con rituximab de pacientes con MG anti-MuSK definidos como pacientes fármacorresistentes.
- ▶ Determinar si la frecuencia de recidivas y la duración del efecto beneficioso del tratamiento varía en función del protocolo de administración de rituximab empleado.

4



RESULTADOS

4.1. ARTÍCULO 1

Clinical Characteristics of Patients with Double-Seronegative Myasthenia Gravis and Antibodies to Cortactin

Elena Cortés-Vicente, MD; Eduard Gallardo, PhD; María Ángeles Martínez, BSc; Jordi Díaz-Manera, PhD; Luis Querol, PhD; Ricard Rojas-Garcia, PhD; Isabel Illa, MD, PhD. JAMA Neurol. 2016;73(9):1099-104.

4.2. ARTÍCULO 2

The Impact of Rituximab Infusion Protocol on the Long-term Outcome in anti-MuSK Myasthenia Gravis

Elena Cortés-Vicente, MD; Ricard Rojas-García MD, PhD; Jordi Díaz-Manera MD, PhD; Luis Querol MD, PhD; Carlos Casasnovas MD, PhD; Antonio Guerrero-Sola MD; José Luis Muñoz-Blanco MD; José Eulalio Bárcena-Llona MD; Celedonio Márquez-Infante MD; Julio Pardo, MD, PhD; Eva María Martínez-Fernández MD, PhD; Mercedes Usón MD; Pedro Oliva-Nacarino MD; Teresa Sevilla MD, PhD; Isabel Illa, MD, PhD. Ann Clin Transl Neurol. Accepted for publication: 20 March 2018.

RESEARCH ARTICLE

The impact of rituximab infusion protocol on the long-term outcome in anti-MuSK myasthenia gravis

Elena Cortés-Vicente^{1,2}, Ricard Rojas-García^{1,2}, Jordi Díaz-Manera^{1,2}, Luis Querol^{1,2}, Carlos Casasnovas³, Antonio Guerrero-Sola⁴, José Luis Muñoz-Blanco⁵, José Eulalio Bárcena-Llona⁶, Celedonio Márquez-Infante⁷, Julio Pardo⁸, Eva María Martínez-Fernández⁹, Mercedes Usón¹⁰, Pedro Oliva-Nacarino¹¹, Teresa Sevilla^{2,12,13} & Isabel Illa^{1,2}

¹Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain

³Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari de Bellvitge – IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

⁴Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, Spain

⁵ALS-Neuromuscular Unit, Department of Neurology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, IISGM, Madrid, Spain

⁶Department of Neurology, Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain

⁷Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology and Neurophysiology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

⁸Department of Neurology, Hospital Clínico, Santiago de Compostela, Spain

⁹Department of Neurology, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain

¹⁰Department of Neurology, Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Spain

¹¹Department of Neurology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

¹²Neuromuscular Unit, Department of Neurology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia, Spain

¹³Department of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Correspondence

Isabel Illa, Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Sant Antoni Maria Claret 167, Barcelona 08025, Spain. Tel: 0034 935565986; Fax: 0034 935565602; E-mail: illa@santpau.cat

Funding Information

I. Illa received research support from the Fondo de Investigación en Salud, Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health (Spain), FIS P16/O1440 (Fondos FEDER). E. Cortés-Vicente was supported by a FIS grant (CM16/00096) from Fondo de Investigación en Salud, Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health (Spain) and Fondo Social Europeo.

Received: 2 February 2018; Revised: 7 March 2018; Accepted: 20 March 2018

doi: 10.1002/acn3.564

Abstract

Objective: To evaluate whether the clinical benefit and relapse rates in anti-muscle-specific kinase (MuSK) myasthenia gravis (MG) differ depending on the protocol of rituximab followed. **Methods:** This retrospective multicentre study in patients with MuSK MG compared three rituximab protocols in terms of clinical status, relapse, changes in treatment, and adverse side effects. The primary effectiveness endpoint was clinical relapse requiring a further infusion of rituximab. Survival curves were estimated using Kaplan–Meier methods and survival analyses were undertaken using Cox proportional-hazards models. **Results:** Twenty-five patients were included: 11 treated with protocol 4 + 2 (375 mg/m²/4 weeks, then monthly for 2 months), five treated with protocol 1 + 1 (two 1 g doses 2 weeks apart), and nine treated with protocol 4 (375 mg/m²/4 weeks). Mean follow-up was 5.0 years (SD 3.3). Relapse occurred in 18.2%, 80%, and 33.3%, and mean time to relapse was 3.5 (SD 1.5), 1.1 (SD 0.4), and 2.5 (SD 1.4) years, respectively. Based on Kaplan–Meier estimates, patients treated with protocol 4 + 2 had fewer and later relapses than patients treated with the other two protocols (log-rank test $P = 0.0001$). Patients treated with protocol 1 + 1 had a higher risk of relapse than patients treated with protocol 4 + 2 (HR 112.8, 95% CI, 5.7–2250.4, $P = 0.002$). Patients treated with protocol 4 showed a trend to a higher risk of relapse than those treated with protocol 4 + 2 (HR 9.2, 95% CI 0.9–91.8, $P = 0.059$). **Interpretation:** This study provides class IV evidence that the 4 + 2 rituximab protocol has a lower clinical relapse rate and produces a more durable response than the 1 + 1 and 4 protocols in patients with MuSK MG.

Introduction

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease caused by antibodies to antigens of the postsynaptic neuromuscular junction and clinically characterized by fatigable muscle weakness.^{1–5} Approximately, 5% of MG patients have autoantibodies against muscle-specific kinase (MuSK),^{6,7} and the frequency is higher if an IgG-specific MuSK-cell-based assay is used to detect these antibodies.⁸ MuSK antibody titers are mainly of the IgG4 subclass and considered to correlate with patients' clinical status.^{9,10} Patients with MuSK MG often present early, severe bulbar and respiratory involvement. Furthermore, they have a poorer response to acetylcholine esterase inhibitors, standard immunosuppressant therapies, and intravenous immunoglobuline than MG patients without MuSK.¹⁰ For these reasons, the need for an efficient drug to treat patients with MuSK MG has long been awaited.

Rituximab, a monoclonal antibody that targets the CD20 antigen in B cells, was first used to treat non-Hodgkin's B-cell lymphoma.^{11–13} However, it later emerged as a highly effective tool to manage autoimmune diseases.^{14,15} As autoreactive B cells have a clear pathogenic role in the development of MG, rituximab has been used in drug-resistant MG patients and several authors have described its benefits.^{16–20} Rituximab has proven to be more effective and to have a longer clinical benefit in patients with antibodies against MuSK^{17,20} than in patients with anti-acetylcholine receptor (AChR)-positive MG.

Rituximab has also shown to be a remarkably effective drug in other IgG4-mediated diseases of the central and peripheral nervous system and connective tissue of the skin or kidneys, such as CIDP with anti-Contactin-1 and anti-Neurofascin-155 antibodies,^{21–23} pemphigus,²⁴ membranous glomerulonephritis,²⁵ and LGI1 limbic encephalitis.^{26–28} All IgG4-mediated disorders seem to share similarities in epitope binding, human leukocyte antigen associations, disease mechanism, and underlying etiology, thus explaining the extraordinary response to rituximab observed in all such disorders.²⁹

We previously reported the benefits of rituximab in a large series of drug-resistant patients (11 AChR-positive MG and 6 MuSK-positive MG). Remarkably, all six patients with MuSK MG achieved minimal manifestations (MM) or a better Myasthenia Gravis Foundation of America post-intervention status (MGFA PIS), and no additional infusions were required during a 31-month follow-up (4–60). The protocol we used was 375 mg/m² weekly for 4 weeks, then monthly for 2 months (4 + 2).¹⁷

Infusion protocols for rituximab in autoimmune disorders^{14,17–25,30} differ, and no protocol has yet been established for rituximab in MuSK MG. We wondered

whether our treatment regimen contributed to the excellent long-term outcome of MuSK MG. Here, we describe the clinical follow-up in 25 patients with MuSK MG treated with different infusion protocols of rituximab. We report the clinical effectiveness, adverse effects, and differences in clinical outcomes in patients treated with the three most commonly used rituximab treatment protocols.

Methods

Patients and clinical evaluation

In this multicentre, retrospective observational study, we included all patients with MuSK MG treated with rituximab at 11 hospitals in Spain between January 1, 2006 and March 31, 2016. We collected demographic and clinical data at onset and during follow-up. Patients were followed until November 30, 2017. To assess the clinical response, the MGFA PIS was determined periodically, and relapse rate and changes in treatment were recorded. The primary effectiveness endpoint was clinical relapse requiring a further infusion of rituximab. Safety was evaluated based on the effects of rituximab treatment on mortality and morbidity.

Treatment protocol

The standard treatment protocol for patients with MuSK MG is first-line prednisone and second-line immunosuppressors (azathioprine/mycophenolate followed by cyclosporine) if the response is not adequate or if the dose of prednisone required is higher than 40 mg every other day. Patients were considered drug-resistant when no significant clinical improvement was achieved after prednisone and at least two second-line immunosuppressants.³¹ Patients with MGFA IV or V and no response to prednisone were treated with rituximab as a second-line drug in accordance with our previous results.¹⁷ Rituximab was administered following one of three protocols: (4 + 2) 375 mg/m² every week for four consecutive weeks and then monthly for the next 2 months; (1 + 1) two 1 g doses separated by 2 weeks; and (4) 375 mg/m² every week for four consecutive weeks. Rituximab re-infusions were administered only if patients relapsed. A relapse was defined as the reappearance of myasthenic symptoms that limited daily activity.

Protocol approval and patients' informed consent

Informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the ethics committees at all

participating hospitals. Permission for compassionate use of rituximab was given by the Spanish Ministry of Health.

Statistical analysis

A descriptive data analysis was performed. Demographic characteristics are reported as means and standard deviations (SD) for quantitative variables and as percentages for categorical variables. Differences between patient subgroups in baseline characteristics were evaluated using ANOVA to compare categorical variables and the Mann–Whitney *U* test to compare quantitative variables. Log-rank tests were used to compare Kaplan–Meier estimates for survival curves for the three treatment groups in a time-to-first-event analysis. Hazard ratios and 95% confidence intervals were estimated using a Cox proportional-hazards model. Survival time was from the date of the first rituximab dose to date of reinfusion due to clinical relapse. Patients with no relapse were censored at date of last follow-up. Data analysis was carried out using Stata 13.0 (StataCorp, College Station, TX) for Windows.

Results

Twenty-five patients with MuSK MG were included in the study: 11 were treated with protocol 4 + 2, five were treated with protocol 1 + 1, and nine were treated with protocol 4. Table 1 summarizes the demographic and clinical characteristics of the three treatment groups. The

only significant difference between groups in baseline characteristics in the univariate analyses was age at onset ($P = 0.035$). Age at which rituximab was started did not differ significantly between groups ($P = 0.449$). Treatment with rituximab was associated with a significant improvement in all patients, and all achieved MM or a better MGFA PIS. After rituximab was started, other treatment, especially prednisone, was decreased or withdrawn in all patients (Table 2). Patients were followed up for a mean of 5.0 years (SD 3.3).

No patient presented severe adverse events. During the infusion, seven patients presented mild symptoms: three of the 11 patients in the 4 + 2 protocol group (one facial paresthesias, one fever, and one skin and mucous itching); one of the five patients in the 1 + 1 protocol group (mild gastrointestinal symptoms); and three of the nine patients in the protocol 4 group (two patients with skin rash and one fatigue). All these symptoms disappeared when premedication with antihistamine and steroid treatment was given before further infusions of rituximab.

Relapse occurred in two patients in group 4 + 2, in four patients in group 1 + 1, and in three patients in group 4, resulting in relapse rates of 18.2%, 80%, and 33.3%, respectively. The mean time to relapse was 3.5 years (SD 1.5, Min 2.5–Max 4.6), 1.1 years (SD 0.4, Min 0.7–Max 1.6), and 2.5 years (SD 1.4, Min 1.2–Max 4.1), respectively. Kaplan–Meier estimates showed a clear difference in survival curves among groups, with patients treated with protocol 4 + 2 having fewer relapses (log-rank test $P = 0.0001$). Survival curves are shown in Figure 1.

Table 1. Demographic and clinical data of patients included in the study and comparison between groups.

	4 + 2 doses (n = 11)	1 + 1 (n = 5)	4 doses (n = 9)	P
Age at onset (years)				
Mean (SD)	47.2 (15.7)	39.5 (17.4)	30.5 (9.6)	0.035
Min–Max	14.7–73.8	18.3–65.9	17.0–45.9	
Sex (% female)	11 (100%)	4 (80%)	9 (100%)	0.200
Worst MGFA class	III B 3 (27.3%)	II B 2 (40%)	III B 6 (66.7%)	0.073
	IV B 6 (54.5%)	III B 1 (20%)	IV B 1 (11.1%)	
	V 2 (18.2%)	IV B 1 (20%)	V 2 (22.2%)	
		V 1 (20%)		
Age when RTX was started (years)				
Mean (SD)	55.4 (12.5)	46.3 (21.9)	49.2 (16.5)	0.449
Min–Max	35.3–78.9	19.4–78.9	26.5–70.1	
Best MGFA PIS	CRS 5 (45.4%)	CSR 1 (20%)	CSR 1 (11.1%)	0.335
	PR 2 (18.2%)	PR 3 (60%)	PR 2 (22.2%)	
	MM 4 (36.4%)	MM 1 (20%)	MM 6 (66.7%)	
Follow-up (years)				
Mean (SD)	6.6 (3.5)	3.5 (1.9)	4.0 (3.3)	0.114
Min–Max	1.4–11.6	1.3–6.3	1.6–11.7	
MGFA PIS last visit	CRS 4 (36.4%)	CRS 2 (40%)	CSR 1 (11.1%)	0.665
	PR 1 (9.1%)	PR 1 (20%)	PR 2 (22.2%)	
	MM 6 (54.6%)	MM 2 (40%)	MM 6 (66.7%)	

Table 2. Previous treatments, treatment before rituximab, and treatment at last evaluation for each patient. Time regarding how long treatment was provided both for treatment before rituximab and treatment at last visit are provided in brackets.

Patient	Rituximab protocol	Previous treatments	Treatment before rituximab (treatment duration)	Treatment at last visit (treatment duration)
1	4 + 2	Pyridostigmine, PDN, IVIG	Pyridostigmine 300 mg per day (6 months), PDN 60 mg per day (1 month)	None (53 months)
2	4 + 2	Pyridostigmine, DFZ, CYA	DFZ 30 mg EOD (99 months), CYA 150 mg every 12 h (87 months), Pyridostigmine 300 mg per day (99 months)	DFZ 6 mg EOD (61 months), Pyridostigmine 240 mg per day (61 months)
3	4 + 2	PDN, IVIG, CYA	PDN 60 mg/5 mg EOD (4 months), CYA 100 mg every 12 h (2 months)	None (59 months)
4	4 + 2	PDN, AZA, MMF, CYA, IVIG	PDN 65 mg EOD (48 months), CYA 150 mg per day (9 months)	PDN 10 mg EOD (23 months)
5	4 + 2	PDN, IVEG, PLEX, Pyridostigmine	PDN 60 mg per day (2 months)	PDN 40 mg EOD (17 months)
6	4 + 2	PDN, THYM, AZA, IVIG, CPH, CYA	Pyridostigmine if needed (38 months) (CPH abandoned 19 months before)	None (24 months)
7	4 + 2	THYM, PDN, AZA, CPH, IVIG, MMF	MMF 2 g per day (3 months)	None (96 months)
8	4 + 2	PDN, THYM, AZA, MMF, CYA, IVIG, CPH	PDN 15 mg EOD (5 months, 245 months in total with PDN), MMF 2 g per day (3 months)	PDN 30 mg EOD (18 months)
9	4 + 2	PDN, AZA	PDN 40 mg EOD (19 months, 79 months in total with PDN)	None
10	4 + 2	PDN, AZA, IVIG, CYA, PLEX	PDN 30 mg EOD (18 months, 51 months in total with PDN), CYA 125 mg per day (6 months)	Pyridostigmine if needed (30 months)
11	4 + 2	PDN, AZA, CYA, IVIG, Pyridostigmine	PDN 80 mg EOD (28 months), Pyridostigmine 300 mg per day (29 months)	PDN 7 mg EOD (3 months)
12	1 + 1	Pyridostigmine, PDN, MMF	PRD 60 mg EOD (1 month), Pyridostigmine if needed	PDN 10 mg EOD (7 months)
13	1 + 1	PDN	PDN 25 mg EOD (6 months), Pyridostigmine if needed	None (12 months) (rituximab when relapse)
14	1 + 1	PDN	PDN 60 mg/30 mg EOD (4 months)	None (35 months)
15	1 + 1	PDN, AZA, MMF	PDN 40 mg per day (1 month, 223 months in total with PDN)	PDN 12.5 mg per day (29 months)
16	1 + 1	IVIG, PDN, MMF, PLEX, CYA	PDN 45 mg EOD (47 months), CYA 100 mg every 12 h (10 months), Pyridostigmine 240 mg every day (11 months)	Pyridostigmine if needed (21 months)
17	4	THYM, Pyridostigmine, PDN, TAC, PLEX	PDN 5 mg EOD (60 months), TAC 2 mg every 12 h (10 months), Pyridostigmine 120 mg per day (96 months)	None (20 months)
18	4	PDN, THYM, IVIG, AZA	PDN 20 mg per day (36 months), MMF 1 g per day (24 months)	MMF 1.500 g per day (30 months)
19	4	Pyridostigmine, PDN, AZA, TAC, IVIG, PLEX	TAC 1, 5 mg every 12 h (23 months), PDN 20 mg EOD (23 months), Pyridostigmine 180 mg per day (35 months)	CYA 125 mg every 12 h (23 months), PDN 50 mg EOD (23 months)
20	4	Pyridostigmine, PDN, AZA, PLEX, IVIG, THYM	PDN 30 mg EOD (264 months), Pyridostigmine 360 mg per day (265 months)	PDN 10 mg per day (45 months)
21	4	Pyridostigmine, PDN, AZA, PLEX, IVIG, THYM	PDN 30 mg per day (300 months)	PDN 10 mg per day (53 months)
22	4	Pyridostigmine, PDN, AZA, PLEX	AZA 111 mg per day (60 months)	None (21 months)
23	4	Pyridostigmine, PDN, AZA, IVIG, PLEX	AZA 111 mg per day (60 months), PDN 30 mg EOD (120 months)	PDN 10 mg EOD (26 months)
24	4	Pyridostigmine, PDN, AZA, MMF	MMF 2.5 g per day (45 months), PDN 30 mg/15 mg EOD (71 months)	PDN 10 mg EOD (12 months)
25	4	PDN, MTX, AZA, MMF, IVIG, PLEX	PDN 70 mg per day (106 months)	None (116 months)

PDN, prednisone; DFZ, Deflazacort; AZA, azathioprine; MMF, Mycophenolate mofetil; CYA, cyclosporine; TAC, Tacrolimus; CPH, cyclophosphamide; MTX, methotrexate; IVIG, intravenous immunoglobulin; PLEX, plasma exchange; THYM, thymectomy; EOD, Every other day.

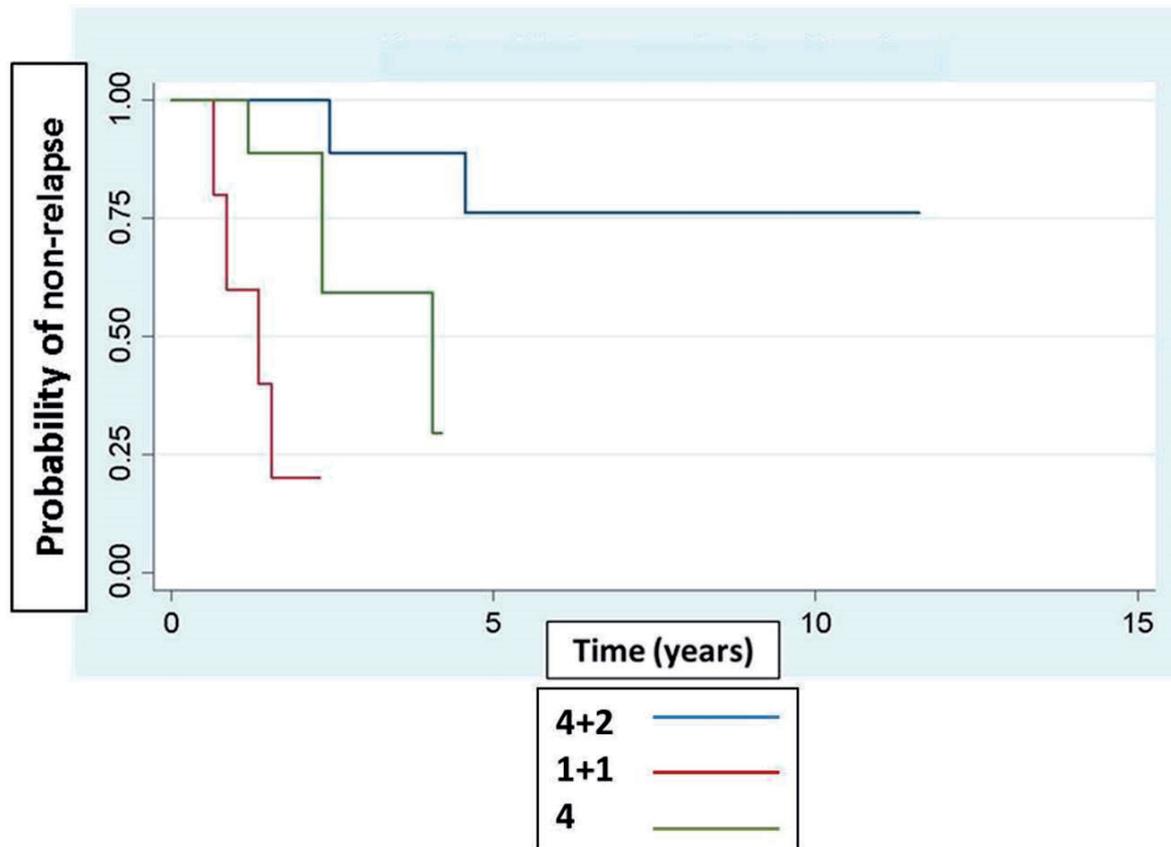


Figure 1. Kaplan–Meier survival curves for relapse in each group of patients with MuSK MG according to the rituximab protocol followed: (4 + 2) 375 mg/m² every week for four consecutive weeks and then monthly for the next 2 months; (1 + 1) two 1 g doses separated by 2 weeks; and (4) 375 mg/m² every week for four consecutive weeks.

The Cox proportional-hazards regression model showed that patients treated with protocol 1 + 1 had a higher risk of relapse and a greater need for reinfusion with rituximab than patients treated with protocol 4 + 2 (hazard ratio [HR] 112.8, 95% confidence interval [CI], 5.7–2250.4, $P = 0.002$). Patients treated with protocol 4 also showed a trend to a higher risk of relapse than patients treated with protocol 4 + 2 (HR 9.2, 95% CI 0.9–91.8, $P = 0.059$) (likelihood ratio test = 15.1, $P = 0.0005$).

Discussion

Rituximab has previously shown level IV evidence as a beneficial and durable treatment option for drug-resistant MuSK MG.^{17,20} Our results further add that the treatment protocol plays a key role in reducing clinical relapse and achieving a long-lasting response. All patients included in this study improved after rituximab treatment and all patients achieved MM or a better MGFA PIS and a long-

lasting response after an extended follow-up. Moreover, prednisone and other immunosuppressive therapies were withdrawn or tapered to lower doses in all cases. Rituximab was also found to be safe as no patient developed severe side effects. The frequency of mild-moderate adverse events did not differ between the three groups. This finding is of particular note because most patients had been treated previously with two or more immunosuppressive therapies. Close follow-up is recommended, however, as several cases of side effects of rituximab have been reported in patients with MG.³²

Various protocols of rituximab have been published to treat patients with MuSK MG, and relapse rates and durability of response have differed.^{17,20} As no infusion regimen has yet been standardized in this setting, we compared the clinical response of 25 MuSK MG patients treated with three different rituximab protocols. Because all patients responded to the drug, the primary effectiveness endpoint chosen was the appearance of a clinical relapse requiring a further infusion of rituximab. Based

on Kaplan–Meier estimates, the most efficient protocol was the 4 + 2 protocol. It showed the lowest relapse rate (18.2%) and the longest time to relapse after an extended follow-up period. The Cox proportional-hazards regression confirmed that patients treated with protocol 1 + 1 had a significantly higher risk of relapse and greater need for reinfusion with rituximab than patients receiving the 4 + 2 protocol. Patients treated with the protocol based on four doses also showed a trend toward a significantly higher risk of relapse than those treated with protocol 4 + 2.

Although prominent B-cell pathology has been described in MuSK MG,^{33–35} the mechanism by which IgG4 antibodies are produced remains unclear. Rituximab works by depleting pre-B cells and mature and memory B cells from the circulation. Exactly how this leads to antibody reduction, however, is still to be determined as B-cell populations that do not express CD20 produce a considerable portion of circulating immunoglobulin.³⁶ Why some patients relapse and other do not is unclear. A recent study of autoantibody-producing cells during disease relapse in three MuSK MG subjects who had previously achieved rituximab-induced remission revealed autoantibody-expressing CD27⁺ B plasmablasts within the reconstituted repertoire during relapse but not during remission or in controls.³⁷ The authors proposed that MuSK-specific memory cells continuously supply a population of short-lived, autoantibody-secreting plasmablasts, and suggested that rituximab works by indirectly depleting the CD20[−] plasmablast population by diminishing CD20⁺ memory B cells. Alternatively, they hypothesized that rituximab could work by directly depleting a fraction of plasmablasts that may be CD20⁺.

In our study, we observed that all patients with MuSK MG treated with rituximab had a beneficial response. However, the relapse rate differed depending on the posology used, with the 4 + 2 protocol being the most effective in terms of response durability. We hypothesize that this protocol is more efficacious in depleting the pool of plasmablasts-progenitor CD20⁺ memory B cells or the subset of CD20⁺ plasmablasts than the two other protocols followed. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

The main limitation of our study is the small number of patients. MuSK MG is a rare disorder, however, and as not all cases are severe or drug-resistant, rituximab is not always required. The strengths of the study are the significant results in the statistical analysis, and particularly the long clinical follow-up, with an overall mean of 5 years.

In summary, our findings add to the evidence that rituximab is effective and safe in the treatment of MuSK MG. We recommend treating patients with a sole induction regimen of rituximab following the protocol 4 + 2 (375 mg/m² every week for 4 consecutive weeks and then

monthly for the next 2 months), since this protocol ensures a minimal rate of clinical relapse and a long-lasting response to rituximab. To minimize potential adverse events, we recommend re-treating patients with rituximab in cases of clinical relapse only.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Department of Medicine at the Universitat Autònoma de Barcelona.

Conflicts of Interest

None.

References

- Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 2015;14:1023–1036.
- Berrih-Aknin S, Souroujon MC. Cutting edge in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev* 2013;12:861–862.
- Drachman DB, de Silva S, Ramsay D, Pestronk A. Humoral pathogenesis of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1987;505:90–105.
- Engel AG, Lindstrom JM, Lambert EH, Lennon VA. Ultrastructural localization of the acetylcholine receptor in myasthenia gravis and in its experimental autoimmune model. *Neurology* 1977;27:307–315.
- Querol L, Illa I. Myasthenia gravis and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol* 2013;26:459–465.
- 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.
- McConville J, Farrugia ME, Beeson D, et al. Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2004;55:580–584.
- Huda S, Waters P, Woodhall M, et al. IgG-specific cell-based assay detects potentially pathogenic MuSK-Abs in seronegative MG. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2017;4:e357.
- Huijbers MG, Zhang W, Klooster R, et al. MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:20783–20788.
- Evoli A, Tonali PA, Padua L, et al. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain* 2003;126(pt 10):2304–2311.
- Anderson DR, Grillo-López A, Varns C, et al. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans* 1997;25:705–708.

E. Cortés-Vicente *et al.*

Rituximab Protocol on the Long-Term Outcome in MuSK Myasthenia

12. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, *et al.* IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:2188–2195.
13. Tobinai K, Kobayashi Y, Narabayashi M, *et al.* Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) in relapsed B-cell lymphoma. The IDEC-C2B8 Study Group. *Ann Oncol* 1998;9:527–534.
14. Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G. B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders. *Biochem Soc Trans* 2002;30:824–828.
15. Looney RJ. Treating human autoimmune disease by depleting B cells. *Ann Rheum Dis* 2002;61:863–866.
16. Lebrun C, Bourg V, Tieulie N, Thomas P. Successful treatment of refractory generalized myasthenia gravis with rituximab. *Eur J Neurol* 2009;16:246–250.
17. Díaz-Manera J, Martínez-Hernández E, Querol L, *et al.* Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology* 2012;78:189–193.
18. Robeson KR, Kumar A, Keung B, *et al.* Durability of the rituximab response in acetylcholine receptor autoantibody-positive myasthenia gravis. *JAMA Neurol* 2017;74:60–66.
19. Tandan R, Hehir MK, Waheed W, Howard DB. Rituximab treatment of myasthenia gravis: a systematic review. *Muscle Nerve* 2017;56:185–196.
20. Hehir MK, Hobson-Webb LD, Benatar M, *et al.* Rituximab as treatment for anti-MuSK myasthenia gravis: multicenter blinded prospective review. *Neurology* 2017;5:1069–1077.
21. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-García R, *et al.* Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 2013;73:370–380.
22. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-García R, *et al.* Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology* 2014;82:879–886.
23. Querol L, Rojas-García R, Díaz-Manera J, *et al.* Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;2:e149.
24. Dupuy A, Viguier M, Bédane C, *et al.* Treatment of refractory pemphigus vulgaris with rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody). *Arch Dermatol* 2004;140:91–96.
25. Roccatello D, Baldovino S, Rossi D, *et al.* Long-term effects of anti-CD20 monoclonal antibody treatment of cryoglobulinaemic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:3054–3061.
26. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, *et al.* Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010;9:776–785.
27. Irani SR, Pettingill P, Kleopa KA, *et al.* Morvan syndrome: clinical and serological observations in 29 cases. *Ann Neurol* 2012;72:241–255.
28. Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, *et al.* Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. *J Neurosci* 2013;33:18161–18174.
29. Huijbers MG, Querol LA, Niks EH, *et al.* The expanding field of IgG4-mediated neurological autoimmune disorders. *Eur J Neurol* 2015;22:1151–1161.
30. Roccatello D, Sciascia S, Baldovino S, *et al.* Improved (4 Plus 2) rituximab protocol for severe cases of mixed cryoglobulinemia: a 6-year observational study. *Am J Nephrol* 2016;43:251–260.
31. Sanders DB, Wolfe GI, Benatar M, *et al.* International consensus guidance for management of myasthenia gravis: executive summary. *Neurology* 2016;87:419–425.
32. Kanth KM, Solorzano GE, Goldman MD. PML in a patient with myasthenia gravis treated with multiple immunosuppressing agents. *Neurol Clin Pract* 2016;6:e17–e19.
33. Guptill JT, Yi JS, Sanders DB, *et al.* Characterization of B cells in muscle-specific kinase antibody myasthenia gravis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;2:e77.
34. Lee JY, Stathopoulos P, Gupta S, *et al.* Compromised fidelity of B-cell tolerance checkpoints in AChR and MuSK myasthenia gravis. *Ann Clin Transl Neurol* 2016;3:443–454.
35. Vander Heiden JA, Stathopoulos P, Zhou JQ, *et al.* Dysregulation of B cell repertoire formation in myasthenia gravis patients revealed through deep sequencing. *J Immunol* 2017;198:1460–1473.
36. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 2005;23:367–386.
37. Stathopoulos P, Kumar A, Nowak RJ, O'Connor KC. Autoantibody-producing plasmablasts after B cell depletion identified in muscle-specific kinase myasthenia gravis. *JCI Insight* 2017;2:e94263. pii: 94263. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94263>.

5

RESUMEN DE RESULTADOS

5.1. ARTÍCULO 1

Los anticuerpos anti-cortactin se han detectado en un subgrupo de pacientes con MG seronegativa. Estos pacientes eran más jóvenes que los pacientes con MG anti-RACH y MG seronegativa sin anticuerpos anti-cortactin, y además mostraban un fenotipo clínico predominantemente ocular o generalizado leve, sin síntomas bulbares. No se ha observado asociación de anti-cortactin con anti-MuSK, anti-LRP4 y anti-músculo estriado. Sin embargo, algunos pacientes con MG anti-RACH sí presentaban anticuerpos anti-cortactin, pero con una frecuencia significativamente menor que los pacientes con MG seronegativa ($p = 0.02$). Ninguno de los controles sanos presentó anticuerpos anti-cortactin.

5.2. ARTÍCULO 2

El rituximab ha demostrado anteriormente con evidencia nivel IV que es una opción terapéutica eficaz y con efecto duradero para pacientes con MG anti-MuSK resistentes a otros fármacos inmunosupresores. Nuestros resultados añaden una información relevante, ya que muestran que el protocolo escogido para administrar el tratamiento juega un papel clave en la reducción de las recidivas clínicas y así lograr una respuesta duradera. En este estudio se han incluido 25 pacientes con MG anti-MuSK tratados con tres protocolos diferentes de rituximab. Todos los pacientes incluidos en el estudio mejoraron con el tratamiento y lograron un MGFA-PIS de remisión completa estable, remisión farmacológica o manifestaciones mínimas, y una respuesta duradera después de un seguimiento prolongado. Además, la prednisona y otras terapias inmunosupresoras se consiguieron retirar o reducir en todos los casos. Sin embargo, los pacientes tratados con el protocolo 4+2 (375 mg/m² cada semana durante 4 semanas consecutivas y luego mensualmente durante los siguientes 2 meses), presentaron la menor frecuencia de recidivas clínicas y la respuesta más duradera.

6

DISCUSIÓN

6.1. ARTÍCULO 1

La MG seronegativa se ha considerado clásicamente similar a la MG con anticuerpos anti-RACH en cuanto a características clínicas y respuesta al tratamiento. Sin embargo, clasificar a los pacientes con MG en subgrupos según criterios serológicos tiene implicaciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes. Por ejemplo, la detección de los anticuerpos anti-MuSK definió un subgrupo de pacientes con una implicación muscular predominantemente bulbar y respiratoria, así como una excelente respuesta clínica a rituximab.

Entre los pacientes con MG seronegativa, aquellos con anticuerpos contra LRP4 afectan con mayor frecuencia a mujeres y son formas clínicas predominantemente oculares o generalizadas leves. Estos anticuerpos tienen una frecuencia baja, y habitualmente coexisten con anti-MuSK. Las características clínicas de los pacientes con anticuerpos anti-RACH de baja afinidad han sido descritas recientemente. Suelen tener un debut temprano y una enfermedad leve con síntomas oculares aislados predominantes y baja tasa de generalización. Se observan síntomas bulbares en un 25% de los pacientes. No existe en la actualidad un método comercial para la detección de estos anticuerpos, por tanto estos anticuerpos solo pueden detectarse en unos pocos centros.

Nuestros resultados confirman que los pacientes con MG seronegativa y anticuerpos anti-cortactin presentan formas clínicas oculares o leves de la enfermedad, y notablemente, no encontramos signos bulbares inicialmente ni durante el seguimiento. Estos hallazgos sugieren que la presencia de los anticuerpos anti-cortactin pueden implicar buen pronóstico en pacientes con MG seronegativa.

Es difícil diagnosticar la MG puramente ocular a un nivel inmunológico porque, contrariamente a lo que ocurre con las formas generalizadas, hasta el 50% de los pacientes con MG ocular son seronegativos para los anticuerpos anti-RACH. En nuestra serie, hasta el 24% de pacientes con MG seronegativa ocular tenía anticuerpos anti-cortactin, por lo que estos anticuerpos constituyen un biomarcador útil especialmente en este grupo de pacientes. Un biomarcador de enfermedad en MG ocular es especialmente relevante porque el diagnóstico diferencial de ptosis y diplopía

incluye varias enfermedades, los tests farmacológicos pueden ser confusos y el resultado del estudio electrofisiológico puede ser normal o dudoso en algunos pacientes.

Hemos encontrado anticuerpos anti-cortactin en el 9.5% de los pacientes con MG anti-RACH, pero las características clínicas de este subgrupo de pacientes fueron similares a los encontrados en pacientes con MG anti-RACH y anti-cortactin negativos. Esto sugiere que los anticuerpos anti-RACH son los dominantes cuando coexisten con los anticuerpos anti-cortactin. En este contexto, el valor de buen pronóstico de los anticuerpos anti-cortactin no sería aplicable. No realizamos la determinación de los anticuerpos anti-RACH de baja afinidad, pero esperaríamos encontrar la presencia de anti-cortactin en coexistencia con estos anticuerpos con la misma frecuencia que en los pacientes con MG anti-RACH. En nuestra serie, no hemos encontrado asociaciones entre anti-cortactin y anticuerpos frente a MuSK, LRP4 y músculo estriado.

Cortactin es una proteína intracelular de la UNM post-sináptica que actúa downstream de agrin/LRP4/MuSK, promoviendo la agrupación del RACH. Debido a este importante papel en la transmisión neuromuscular, cortactin se ha considerado como un antígeno potencial en la patogénesis de la MG. Si bien la patogenicidad de los anticuerpos contra el RACH se demostró hace mucho tiempo y el papel patogénico también se ha demostrado para los anticuerpos anti-MuSK, queda por determinar cómo los anticuerpos anti-cortactin se generan y si son patogénicos. El hecho de que la mayoría de los pacientes no tenían otros autoanticuerpos sugiere que los anti-cortactin no surgen como consecuencia de epitope spreading o daño en la UNM. Sin embargo, la presencia de anticuerpos anti-cortactin se ha encontrado en otras enfermedades autoinmunes neuromusculares y también en alrededor del 5% de los controles sanos. Esto podría sugerir que no juegan un papel en la patogenia de la MG, pero aun así deben ser considerados un buen biomarcador en MG seronegativa.

En este estudio, confirmamos que los anticuerpos anti-cortactin son significativamente más frecuentes en MG seronegativa, una entidad clínica en la que la ausencia de un marcador diagnóstico puede dificultar el manejo clínico de los pacientes. Por esta razón, aunque su papel

patogénico todavía no se ha demostrado, el hallazgo de anticuerpos anti-cortactin en pacientes con MG seronegativa es una herramienta clínica útil y apoya el uso de tratamiento inmunosupresor si es clínicamente necesario.

La principal limitación del estudio es que el grupo de pacientes con MG seronegativa y anticuerpos anti-cortactin es pequeño a pesar de que se ha testado una gran número de muestras de suero de pacientes con MG. En una muestra más grande de pacientes con MG seronegativa, podría ser posible observar diferencias estadísticamente significativas en las variables sexo, necesidad de tratamiento inmunosupresor, generalización de la enfermedad o presencia de timoma, ya que encontramos diferencias en estas características entre ambos grupos con tendencia a la significación estadística.

6.1. ARTÍCULO 2

Se han publicado diversos protocolos de rituximab para tratar la MG anti-MuSK, y la frecuencia de recaídas y la durabilidad de la respuesta son diferentes. Ya que no existe un protocolo estandarizado de infusión en este momento, en este estudio hemos comparado la respuesta clínica de 25 pacientes con MG anti-MuSK tratados con tres diferentes regímenes de rituximab. Debido a que todos los pacientes respondieron al fármaco, se eligió como endpoint principal para valorar la efectividad la aparición de una recaída clínica que requiriera tratamiento con una nueva administración de rituximab. Según las estimaciones de Kaplan-Meier, el protocolo más eficiente fue el protocolo 4+2. Mostró la frecuencia de recaída más baja (18.2%) y la duración más prolongada del efecto durante un amplio período de seguimiento. La regresión de riesgos proporcionales de Cox confirmó que los pacientes tratados con el protocolo 1+1 tenían un riesgo significativamente mayor de recaída y una mayor necesidad de reinfusión con rituximab que los pacientes que recibían el protocolo 4+2. Los pacientes tratados con el protocolo basado en 4 dosis también mostraron una tendencia hacia un mayor riesgo de presentar un mayor número de recaídas que aquellos tratados con el protocolo 4+2.

El estudio muestra que el rituximab es un fármaco seguro, ya que ningún paciente desarrolló efectos secundarios graves. La frecuencia de efectos adversos leves a moderados no fue diferente

entre los tres grupos. Este hallazgo es de particular interés porque la mayoría de los pacientes habían sido tratados previamente con dos o más fármacos inmunosupresores. Sin embargo, se recomienda un seguimiento estrecho, ya que se han reportado varios casos de efectos secundarios de rituximab en pacientes con MG.

Las células B están prominentemente implicadas en la fisiopatología de la MG anti-MuSK, pero el mecanismo por el cual se producen los anticuerpos IgG4 sigue sin estar claro. Rituximab funciona eliminando las células pre-B, y las células B maduras y memoria de la circulación general. Sin embargo, aún no se ha determinado exactamente cómo este hecho lleva a la reducción de anticuerpos, ya que las poblaciones de células B que no expresan CD20 producen una porción considerable de las inmunoglobulinas circulantes. No está claro por qué algunos pacientes recidivan y otros no. Un estudio reciente de células productoras de autoanticuerpos durante la recidiva de 3 pacientes con MG anti-MuSK que habían alcanzado previamente la remisión clínica con rituximab mostró la existencia de plasmablastos B CD27+ productores de autoanticuerpos dentro del repertorio reconstituido durante la recidiva pero no durante la remisión o en los controles. Los autores propusieron como hipótesis que las células memoria específicas de MuSK suministran continuamente una población de plasmablastos de vida corta secretores de autoanticuerpos, y sugirieron que el rituximab funciona al reducir indirectamente la población de plasmablastos CD20- mediante la disminución de las células B memoria CD20+. Alternativamente, hipotetizaron que el rituximab podría funcionar suprimiendo directamente una fracción de plasmablastos que podrían ser CD20+.

En nuestro estudio, observamos que todos los pacientes con MG anti-MuSK tratados con rituximab presentaron una buena respuesta clínica. Sin embargo, la frecuencia de recaídas difirió dependiendo de la posología utilizada, siendo el protocolo 4+2 el más eficaz en cuanto a la durabilidad de la respuesta. Es posible que este protocolo sea más eficaz en la reducción de la población de plasmablastos/células B memoria CD20+ progenitoras o el grupo de plasmablastos CD20+ que los otros dos protocolos utilizados. Se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

La principal limitación de nuestro estudio es el pequeño número de pacientes incluidos. La MG anti-MuSK es una enfermedad infrecuente, y no todos los casos son graves y fármacorresistentes, por tanto el rituximab no siempre es necesario para su tratamiento. Las fortalezas del estudio son los resultados estadísticamente significativos y, especialmente, el largo seguimiento clínico, de 5 años de media.

En resumen, nuestros resultados suman a la evidencia científica que rituximab es un fármaco efectivo y seguro en el tratamiento de los pacientes con MG anti-MuSK. Nuestra recomendación es tratar con un único régimen de inducción de rituximab siguiendo el protocolo 4+2 (375 mg/m² cada semana durante 4 semanas consecutivas y luego mensualmente durante los siguientes 2 meses), ya que este protocolo asegura una frecuencia mínima de recaídas clínicas y una respuesta de larga duración al rituximab. Para minimizar los posibles eventos adversos, recomendamos retratar a los pacientes con rituximab únicamente en casos de recaída clínica.

7



CONCLUSIONES

Las conclusiones de la hipótesis **“Los anticuerpos anti-cortactin son un biomarcador en MG seronegativa y los pacientes que los presentan muestran un fenotipo clínico determinado”** son:

- ▶ Los anticuerpos anti-cortactin son significativamente más frecuentes en MG seronegativa que en MG con anticuerpos anti-RACH y no se asocian con anticuerpos anti-MuSK, anti-LRP4 o anti-musculo estriado.
- ▶ Los pacientes con MG seronegativa y anticuerpos anti-cortactin tienen un fenotipo ocular o generalizado leve, MGFA I o IIA, sin síntomas bulbares.
- ▶ La presencia de los anticuerpos anti-cortactin ayuda en el diagnóstico de la MG autoinmune y apoya el tratamiento con inmunosupresores si clínicamente es necesario.

Las conclusiones de la hipótesis **“Rituximab es eficaz para el tratamiento de la MG anti-MuSK fármacorresistente y su posología determina la frecuencia de recaídas y duración del efecto beneficioso”** son:

- ▶ El impacto en el número de recidivas y en la duración de la respuesta es significativamente diferente dependiendo del protocolo de rituximab utilizado.
- ▶ El protocolo 4+2 de rituximab (375 mg/m² cada semana durante 4 semanas consecutivas y luego mensualmente durante los siguientes 2 meses) tiene la tasa de recidiva clínica más baja y el efecto más duradero comparado con los protocolos 1+1 (dos dosis de 1 g separadas por 2 semanas) y 4 (375 mg/m² cada semana durante 4 semanas consecutivas) en pacientes con MG anti-MuSK.

8

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

Las conclusiones de la hipótesis **“Los anticuerpos anti-cortactin son un biomarcador en MG seronegativa y los pacientes que los presentan muestran un fenotipo clínico determinado”** abren las siguientes nuevas líneas de investigación:

- ▶ El estudio del posible papel patogénico de los anticuerpos anti-cortactin.
- ▶ El valor de los anticuerpos anti-cortactin como biomarcador de la evolución de la enfermedad.

Las conclusiones de la hipótesis **“Rituximab es eficaz para el tratamiento de la MG anti-MuSK fármacorresistente y su posología determina la frecuencia de recaídas y duración del efecto beneficioso”** abren las siguientes nuevas líneas de investigación:

- ▶ El estudio de las causas por las cuales la posología del rituximab influye en su efecto biológico y clínico.
- ▶ El estudio de las causas de recidiva de los pacientes con MG anti-MuSK tras alcanzar la remisión clínica con el tratamiento con rituximab.

9

BIBLIOGRAFÍA

1. Drachman DB. Myasthenia Gravis, review. *N Engl J Med.* 1994; 330(25):1797-810.
2. Gilhus NE. Myasthenia Gravis. *N Engl J Med.* 2016;375(26):2570-81.
3. Querol L, Illa I. Myasthenia gravis and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol.* 2013;26(5):459-65.
4. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol.* 2009;8(5):475-90.
5. Aragonès JM, Bolívar I, Bonfill X, Buñill E, Mummany A, Alonso F, et al. Myasthenia gravis: A higher than expected incidence in the elderly. *Neurology.* 2003;60(6):1024-6.
6. Aragonès J-M, Roura-Poch P, Hernández-Ocampo EM, Alonso F, Pont-Lluelles M, Xandri I, et al. Myasthenia gravis: a disease of the very old. *J Am Geriatr Soc.* 2014;62(1):196-7.
7. Carr A, Cardwell C, McCarron P, McConville J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol.* 2010;10(46):1-9.
8. Montomoli C, Citterio A, Piccolo G, Cioccale R, Ferretti V V., Fratti C, et al. Epidemiology and geographical variation of myasthenia gravis in the province of Pavia, Italy. *Neuroepidemiology.* 2012;38(2):100-5.
9. Santos E, Coutinho E, Moreira I, Martins Silva A, Lopes D, Costa H, et al. Epidemiology of Myasthenia Gravis in Northern Portugal: Frequency estimates and clinical epidemiological distribution of cases. *Muscle Nerve.* 2016;54(3):413-21.
10. Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun.* 2014;52:90-100.
11. Ramos-Fransi A, Rojas-García R, Segovia S, Márquez-Infante C, Pardo J, Coll-Cantí J, et al. Myasthenia gravis: Descriptive analysis of life-threatening events in a recent nationwide registry. *Eur J Neurol.* 2015;22(7):1056-61.
12. Gomez AM, Van Den Broeck J, Vrolix K, Janssen SP, Lemmens MAM, Van Der Esch E, et al. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis - Pathogenesis at the neuromuscular junction. *Autoimmunity.* 2010;43(5-6):353-70.
13. Sanes JR, Lichtman JW. Induction, Assembly, Maturation and Maintenance of a Postsynaptic Apparatus. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(11):791-805.
14. Karlin A. Ion Channel Structureemerging Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(2):102-14.
15. Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, Lazaridis K, Zisimopoulou P, Tzartos S. Myasthenia gravis - Autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(5):259-68.
16. Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune Response to Acetylcholine Receptor. *Science.* 1973;180(4088):871-2.
17. Lennon V, Lambert E. Myasthenia Gravis induced by monoclonal antibodies to acetylcholine receptors. *Nature.* 1980;285(5762):238-40.
18. Toyka KV, Drachman DB, Griffin DE, Pestronk A, Winkelstein JA, Fishbeck KH, et al. Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med.* 1977;296(3):125-31.
19. Rødgaard A, Nielsen FC, Djurup R, Somnier F, Gammeltoft S. Acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: predominance of IgG subclasses 1 and 3. *Clin Exp Immunol.* 1987;67(1):82-8.

20. Drachman DB, Adams RN, Stanley EF, Pestronk A. Mechanisms of acetylcholine receptor loss in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1980;43(7):601-10.
21. Drachman DB, Angus CW, Adams RN, Michelson JD, Hoffman GJ. Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N Engl J Med*. 1978;298(20):1116-22.
22. Phillips WD, Vincent A. Pathogenesis of myasthenia gravis: update on disease types, models, and mechanisms. *F1000Research*. 2016;5(0):1513.
23. Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2006;116(11):2843-54.
24. Tindall RSA. Humoral immunity in myasthenia gravis: biochemical characterization of acquired antireceptor antibodies and clinical correlations. *Ann Neurol*. 1981;10(1):437-47.
25. Luo J, Taylor P, Losen M, De Baets MH, Shelton GD, Lindstrom J. Main immunogenic region structure promotes binding of conformation-dependent myasthenia gravis autoantibodies, nicotinic acetylcholine receptor conformation maturation, and agonist sensitivity. *J Neurosci*. 2013;29(44):13898-908.
26. Evoli A, Tonali PA, Padua L, Lo Monaco M, Scuderi F, Batocchi AP, et al. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain*. 2003;126(10):2304-11.
27. Klooster R, Plomp JJ, Huijbers MG, Niks EH, Straasheijm KR, Detmers FJ, et al. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain*. 2012;135(4):1081-101.
28. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent a. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*. 2001;7(3):365-8.
29. McConville J, Farrugia ME, Beeson D, Kishore U, Metcalfe R, Newsom-Davis J, et al. Detection and Characterization of MuSK Antibodies in Seronegative Myasthenia Gravis. *Ann Neurol*. 2004;55(4):580-4.
30. Huijbers MG, Zhang W, Klooster R, Niks EH, Friese MB, Straasheijm KR, et al. MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(51):20783-8.
31. Plomp JJ, Huijbers MG, van der Maarel SM, Verschuuren JJ. Pathogenic IgG4 subclass autoantibodies in MuSK myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1275(1):114-22.
32. Niks EH, van Leeuwen Y, Leite MI, Dekker FW, Wintzen AR, Wirtz PW, et al. Clinical fluctuations in MuSK myasthenia gravis are related to antigen-specific IgG4 instead of IgG1. *J Neuroimmunol*. 2008;195(1-2):151-6.
33. Díaz-Manera J, Martínez-Hernández E, Querol L, Klooster R, Rojas-García R, Suárez-Calvet X, et al. Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology*. 2012;78(3):189-93.
34. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Martinez-Hernandez E, Diaz-Manera J, Suárez-Calvet X, et al. Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*. 2013;73(3):370-80.
35. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Diaz-Manera J, Pardo J, Ortega-Moreno A, et al. Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVlg. *Neurology*. 2014;82(10):879-86.
36. Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Anhalt GJ, Labib RS, et al. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med*. 1989;320(22):1463-9.

37. Salant DJ. M-Type Phospholipase A2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. *N Engl J Med*. 2010;361(1):11-21.
38. Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, et al. Autoantibodies to Epilepsy-Related LGI1 in Limbic Encephalitis Neutralize LGI1-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *J Neurosci*. 2013;33(46):18161-74.
39. Lai M, Huijbers MGM, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: A case series. *Lancet Neurol*. 2010;9(8):776-85.
40. Huijbers MG, Querol LA, Niks EH, Plomp JJ, van der Maarel SM, Graus F, et al. The expanding field of IgG4-mediated neurological autoimmune disorders. *Eur J Neurol*. 2015;22(8):1151-61.
41. Romi F, Gilhus NE, Aarli JA. Myasthenia gravis: Disease severity and prognosis. *Acta Neurol Scand*. 2006;113(SUPPL. 183):24-5.
42. Mossman S, Vincent A, Newsom-Davis J. Myasthenia gravis without acetylcholine-receptor antibody: a distinct disease entity. *Lancet*. 1986;1(8473):116-9.
43. Newsom-Davis J, Willcox N, Schluep M, Harcourt G, Vincent A, Mossman S, et al. Immunological Heterogeneity and Cellular Mechanisms in Myasthenia Gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;505(1):12-26.
44. Burges J, Vincent A, Molenaar PC, Newsom-Davis J, Peers C, Wray D. Passive transfer of seronegative myasthenia gravis to mice. *Muscle Nerve*. 1994;17(12):1393-400.
45. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 4 in Myasthenia Gravis. *Ann Neurol*. 2011;69(2):418-22.
46. Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, Ragheb S, Bealmeas B, Lewis RA, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol*. 2012;69(4):445-51.
47. Pevzner A, Schoser B, Peters K, Cosma NC, Karakatsani A, Schalke B, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibodynegative myasthenia gravis. *J Neurol*. 2012;259(3):427-35.
48. Mori S, Motohashi N, Takashima R, Kishi M, Nishimune H, Shigemoto K. Immunization of mice with LRP4 induces myasthenia similar to MuSK-associated myasthenia gravis. *Exp Neurol*. 2017;297:158-67.
49. Jacob S, Viegas S, Leite MI, Webster R, Cossins J, Kennett R, et al. Presence and pathogenic relevance of antibodies to clustered acetylcholine receptor in ocular and generalized myasthenia gravis. *Arch Neurol*. 2012; 69(8):994-1001.
50. Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in "seronegative" myasthenia gravis. *Brain*. 2008;131(7):1940-52.
51. Cruz PMR, Al-Hajjar M, Huda S, Jacobson L, Woodhall M, Jayawant S, et al. Clinical features and diagnostic usefulness of antibodies to clustered acetylcholine receptors in the diagnosis of seronegative myasthenia gravis. *JAMA Neurol*. 2015;72(6):642-9.
52. Vincent A, Leite MI, Farrugia ME, Jacob S, Viegas S, Shiraishi H, et al. Myasthenia gravis seronegative for acetylcholine receptor antibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132:84-92.
53. Gallardo E, Martínez-Hernández E, Titulaer MJ, Huijbers MG, Martínez MA, Ramos A, et al. Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(10):1003-7.
54. Madhavan R, Gong ZL, Ma JJ, Chan AWS, Peng HB. The function of cortactin in the clustering of acetylcholine receptors at the vertebrate neuromuscular junction. *PLoS One*. 2009; 4(12):e8478.

55. Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguás E, Grau-Junyent JM, Vilardell-Tarrés M, et al. Identification of a novel myositis-associated antibody directed against cortactin. *Autoimmun Rev.* 2014;13(10):1008-12.
56. Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis: Subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* 2015;14(10):1023-36.
57. Baggi F, Andreetta F, Antozzi C, Simoncini O, Confalonieri P, Labeit S, et al. Anti-titin and antiryanodine receptor antibodies in myasthenia gravis patients with thymoma. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 May 13;841:538-41.
58. Aarli JA, Stefansson K, Marton LS, Wollmann RL. Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin. *Clin Exp Immunol.* 1990;82(2):284-8.
59. Romi F, Skeie GO, Vedeler C, Aarli J a, Zorzato F, Gilhus NE. Complement activation by titin and ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2000;111(1-2):169-76.
60. Gasperi C, Melms A, Schoser B, Zhang Y, Meltoranta J, Risson V, et al. Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis. *Neurology.* 2014;82(22):1976-83.
61. Ramanujam R, Pirskanen R, Ramanujam S, Hammarström L. Utilizing twins concordance rates to infer the predisposition to myasthenia gravis. *Twin Res Hum Genet.* 2011;14(2):129-36.
62. Vandiedonck C, Giraud M, Garchon HJ. Genetics of autoimmune myasthenia gravis: The multifaceted contribution of the HLA complex. *J Autoimmun.* 2005;25(SUPPL.):6-11.
63. Giraud M, Vandiedonck C, Garchon H-J. Genetic Factors in Autoimmune Myasthenia Gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132(1):180-92.
64. Avidan N, Le Panse R, Berrih-Aknin S, Miller A. Genetic basis of myasthenia gravis - A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2014;52:146-53.
65. Téllez-Zenteno JF, Hernández-Ronquillo L, Salinas V, Estanol B, Da Silva O. Myasthenia gravis and pregnancy: Clinical implications and neonatal outcome. *BMC Musculoskelet Disord.* 2004;5:5-9.
66. Leker RR, Karni A, Abramsky O. Exacerbation of myasthenia gravis during the menstrual period. *J Neurol Sci.* 1998;156(1):107-11.
67. Poulas K, Koutsouraki E, Kordas G, Kokla A, Tzartos SJ. Anti-MuSK- and anti-AChR-positive myasthenia gravis induced by d-penicillamine. *J Neuroimmunol.* 2012;250(1-2):94-8.
68. Batocchi AP, Evoli A, Servidei S, Palmisani MT, Apollo F, Tonali P. Myasthenia gravis during interferon alfa therapy. *Neurology.* 1995;45(2):382-3.
69. Cavalcante P, Serafini B, Rosicarelli B, Maggi L, Barberis M, Antozzi C, et al. Epstein-Barr virus persistence and reactivation in myasthenia gravis thymus. *Ann Neurol.* 2010;67(6):726-38.
70. Leis AA, Szatmary G, Ross MA, Stokic DS. West Nile virus infection and myasthenia gravis. *Muscle Nerve.* 2014;49(1):26-9.
71. Thiruppathi M, Rowin J, Li Jiang Q, Sheng JR, Prabhakar BS, Meriggioli MN. Functional defect in regulatory T cells in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1274(1):68-76.
72. Gertel-Lapter S, Mizrachi K, Berrih-Aknin S, Fuchs S, Souroujon MC. Impairment of regulatory T cells in myasthenia gravis: Studies in an experimental model. *Autoimmun Rev.* 2013;12(9):894-903.

73. Gradolatto A, Nazzal D, Truffault F, Bismuth J, Fadel E, Foti M, et al. Both Treg cells and Tconv cells are defective in the Myasthenia gravis thymus: Roles of IL-17 and TNF- α . *J Autoimmun.* 2014;52:53-63.
74. Bernasconi P, Barberis M, Baggi F, Passerini L, Cannone M, Arnoldi E, et al. Increased Toll-like receptor 4 expression in thymus of myasthenic patients with thymitis and thymic involution. *Am J Pathol.* 2005;167(1):129-39.
75. Wang YZ, Yan M, Tian FF, Zhang JM, Liu Q, Yang H, et al. Possible involvement of toll-like receptors in the pathogenesis of myasthenia gravis. *Inflammation.* 2013;36(1):121-30.
76. Lee J-Y, Stathopoulos P, Gupta S, Bannock JM, Barohn RJ, Cotzomi E, et al. Compromised fidelity of B-cell tolerance checkpoints in AChR and MuSK myasthenia gravis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016;3(6):443-54.
77. Vander Heiden JA, Stathopoulos P, Zhou JQ, Chen L, Gilbert TJ, Bolen CR, et al. Dysregulation of B Cell Repertoire Formation in Myasthenia Gravis Patients Revealed through Deep Sequencing. *J Immunol.* 2017;198(4):1460-73.
78. Huijbers MG, Vink AFD, Niks EH, Westhuis RH, van Zwet EW, de Meel RH, et al. Longitudinal epitope mapping in MuSK myasthenia gravis: Implications for disease severity. *J Neuroimmunol.* 2016;291:82-8.
79. Stathopoulos P, Kumar A, Nowak RJ, O'Connor KC. Autoantibody-producing plasmablasts after B cell depletion identified in muscle-specific kinase myasthenia gravis. *JCI Insight.* 2017;2(17).
80. Marx A, Pfister F, Schalke B, Saruhan-Direskeneli G, Melms A, Ströbel P. The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmun Rev.* 2013;12(9):875-84.
81. Romi F. Thymoma in Myasthenia Gravis: From Diagnosis to Treatment. *Autoimmune Dis.* 2011;2011:1-5.
82. Mikhail M, Mekhail Y, Mekhail T. Thymic neoplasms: A clinical update. *Curr Oncol Rep.* 2012;14(4):350-8.
83. Scarpino S, Di Napoli A, Stoppacciaro A, Antonelli M, Pillozzi E, Chiarle R, et al. Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):504-12.
84. Illa I, Díaz-Manera JA, Juárez C, Rojas-García R, Molina-Porcel L, Aleu A, et al. Miastenia gravis «seronegativa» y anticuerpos antiMuSK positivos: Descripción de una serie Española. *Med Clin (Barc).* 2005;125(3):100-2.
85. Jaretzki A, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keesey JC, Penn AS, et al. Myasthenia gravis: Recommendations for clinical research standards. *Neurology.* 2000;55(1):16-23.
86. Lindstrom J, Seybold M, Lennon V, Whittingham S, Duane D. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *Neurology.* 1976;(November):1054-9.
87. Chiou-Tan FY, Tim RW, Gilchrist JM, Weber CF, Wilson JR, Benstead TJ, et al. Practice parameter for repetitive nerve stimulation and single fiber EMG evaluation of adults with suspected myasthenia gravis or Lambert-Eaton myasthenic syndrome: Summary statement. *Muscle and Nerve.* 2001;24(9):1236-8.
88. Meriggioli MN, Sanders DB. Advances in the diagnosis of neuromuscular junction disorders. *Am J Phys Med Rehabil.* 2005;84(8):627-38.
89. Pascuzzi RM. The Edrophonium Test. *Semin Neurol.* 2003;23(1):83-8.
90. Larner AJ. The place of the ice pack test in the diagnosis of myasthenia gravis. *Int J Clin Pract.* 2004;58(9):887-8.
91. Sanders DB, Wolfe GI, Benatar M, Evoli A, Gilhus NE, Illa I, et al. International consensus guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary. 2016;87(4):419-25.
92. Skeie GO, Apostolski S, Evoli A, Gilhus NE, Illa I, Harms L, et al. Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol.* 2010;17(7):893-902.

93. Díaz-Manera J, Rojas-García R, Illa I. Treatment strategies for myasthenia gravis. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(8):1329-42.
94. Evoli A, Alboini PE, Damato V, Lorio R. 3,4-Diaminopyridine may improve Myasthenia Gravis with MuSK antibodies. *Neurology*. 2016;86(11):1070-1.
95. Wolfe GI, Kaminski HJ, Aban IB, Minisman G, Kuo HC, Marx A, et al. Randomized trial of thymectomy in myasthenia gravis. *N Engl J Med*. 2016;375(6):511-22.
96. Jurado J, Javidfar J, Newmark A, Lavelle M, Bacchetta M, Gorenstein L, et al. Minimally invasive thymectomy and open thymectomy: Outcome analysis of 263 patients. *Ann Thorac Surg*. 2012;94(3):974-82.
97. Barth D, Nabavi Nouri M, Ng E, Nwe P, Bril V. Comparison of IVIg and PLEX in patients with myasthenia gravis. *Neurology*. 2011;76(23):2017-23.
98. Illa I. IVIg in myasthenia gravis, Lambert Eaton myasthenic syndrome and inflammatory myopathies: Current status. *J Neurol*. 2005; 252 Suppl 1:114-8.
99. Bourque PR, Pringle CE, Cameron W, Cowan J, Chardon JW. Subcutaneous immunoglobulin therapy in the chronic management of myasthenia gravis: A retrospective cohort study. *PLoS One*. 2016;11(8):1-9.
100. Pascuzzi RM, Coslett HB, Johns TR. Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients. *Ann Neurol*. 1984;15(3):291-8.
101. Cosi V, Citterio A, Lombardi M, Piccolo G, Romani A, Erbetta A. Effectiveness of steroid treatment in myasthenia gravis: a retrospective study. *Acta Neurol Scand*. 1991;84(1):33-9.
102. Evoli A, Batocchi AP, Palmisani MT, Lo Monaco M, Tonali PA. Long-Term Results of Corticosteroid Therapy in Patients with Myasthenia Gravis. *Eur Neurol*. 1992;32:37-43.
103. Mantegazza R, Antozzi C, Peluchetti D, Sghirlanzoni A, Cornelio F. Azathioprine as a single drug or in combination with steroids in the treatment of myasthenia gravis. *J Neurol*. 1988;235:449-53.
104. Witte AS, Cornblath DR, Parry GJ, Lisak RP, Schatz NJ. Azathioprine in the treatment of myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 1984;15(6):602-5.
105. Jack KL, Koopman WJ, Hulley D, Nicolle MW. A Review of Azathioprine-Associated Hepatotoxicity and Myelosuppression in Myasthenia Gravis. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2016;18(1):12-20.
106. Chaudhry V, Cornblath DR, Griffin JW, O'Brien R, Drachman DB. Mycophenolate mofetil : A safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases. *Neurology*. 2001 Jan 9;56(1):94-6.
107. Meriggioli MN, Ciafaloni E, Al-Hayk KA, Rowin J, Tucker-Lipscomb B, Massey JM, et al. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis: An analysis of efficacy, safety, and tolerability. *Neurology*. 2003;61(10):1438-40.
108. Sanders DB. A trial of mycophenolate mofetil with prednisone as initial immunotherapy in myasthenia gravis. *Neurology*. 2008;71(6):394-9.
109. Sanders DB, Hart IK, Mantegazza R, Shukla SS, Siddiqi ZA, Baets MHV De, et al. An international , phase III , randomized trial of mycophenolate mofetil in myasthenia gravis. *Neurology*. 2008;71:400-6.
110. Tindall R. Preliminary Results of a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Cyclosporine in Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*. 1987;316(12):719-24.
111. Tindall RSA, Phillips JT, Rollins JA, Wells L, Hall K. A Clinical Therapeutic Trial of Cyclosporine in Myasthenia Gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;681:539-51.

112. Ciafaloni E, Nikhar NK, Massey JM, Sanders DB. Retrospective analysis of the use of cyclosporine in myasthenia gravis. *Neurology*. 2000;55(3):448-50.
113. Anderson DR, Grillo-López A, Varns C, Chambers KS, Hanna N. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans*. 1997;25(2):705-8.
114. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin Lymphoma. *Blood*. 1997;90(6):2188-95.
115. Looney RJ. Treating human autoimmune disease by depleting B cells. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(10):863-6.
116. Randall KL. Rituximab in autoimmune diseases. *Aust Prescr*. 2016;39(4):131-4.
117. Lebrun C, Bourg V, Tieulie N, Thomas P. Successful treatment of refractory generalized myasthenia gravis with rituximab. *Eur J Neurol*. 2009;16(2):246-50.
118. Hehir MK, Hobson-Webb LD, Benatar M, Barnett C, Silvestri NJ, Howard JF, et al. Rituximab as treatment for anti-MuSK myasthenia gravis: Multicenter blinded prospective review. *Neurology*. 2017;89(10):1069-77.
119. Tandan R, Hehir MK, Waheed W, Howard DB. Rituximab treatment of myasthenia gravis: A systematic review. *Muscle Nerve*. 2017;56(2):185-96.
120. Robeson KR, Kumar A, Keung B, DiCapua DB, Grodinsky E, Patwa HS, et al. Durability of the rituximab response in acetylcholine receptor autoantibody-positivemyasthenia gravis. *JAMA Neurol*. 2017;74(1):60-6.
121. Querol L, Rojas-García R, Díaz-Manera J, Barcena J, Pardo J, Ortega-Moreno A, et al. Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neurol Neuroimmunol NeuroInflammation*. 2015;2(5):e149.
122. Dupuy A, Viguier M, Bedane C, Cordoliani F, Blaise S, Aucouturier F, et al. Treatment of refractory pemphigus vulgaris with rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody). *Arch Dermatol*. 2004;140(1):91-6.
123. Roccatello D, Baldovino S, Rossi D, Mansouri M, Naretto C, Gennaro M, et al. Long-term effects of anti-CD20 monoclonal antibody treatment of cryoglobulinaemic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(12):3054-61.
124. Kanth KM, Solorzano GE, Goldman MD. PML in a patient with myasthenia gravis treated with multiple immunosuppressing agents. *Neurol Clin Pract*. 2016;6(2):e17-9.
125. Mozessohn L, Chan KKW, Feld JJ, Hicks LK. Hepatitis B reactivation in HBsAg-negative/HBcAb-positive patients receiving rituximab for lymphoma: A meta-analysis. *J Viral Hepat*. 2015;22(10):842-9.
126. Ponseti JM, Gamez J, Azem J, López-Cano M, Vilallonga R, Armengol M. Tacrolimus for myasthenia gravis: A clinical study of 212 patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132:254-63.
127. Nagane Y, Utsugisawa K, Obara D, Kondoh R, Terayama Y. Efficacy of low-dose FK506 in the treatment of myasthenia gravis - A randomized pilot study. *Eur Neurol*. 2005;53(3):146-50.
128. Yoshikawa H, Kiuchi T, Saida T, Takamori M. Randomised, double-blind, placebo-controlled study of tacrolimus in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(9):970-7.
129. De Feo LG, Schottlender J, Martelli NA, Molfino NA. Use of intravenous pulsed cyclophosphamide in severe, generalized myasthenia gravis. *Muscle and Nerve*. 2002;26(1):31-6.
130. Drachman DB, Jones RJ, Brodsky RA. Treatment of refractory myasthenia: "Rebooting" with high-dose cyclophosphamide. *Ann Neurol*. 2003;53(1):29-34.

