



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
DIAGNÓSTICOS Y FACTORES
PRONÓSTICOS EN LA
MIASTENIA GRAVIS”**



Doctoranda:

Alba Ramos Fransi

Directora:

Dra. Isabel Illa Sendra

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

BARCELONA 2016

A la Isabel, per haver-me ajudat a tirar endavant aquesta tesi. Sense la teva experiència i dedicació aquest treball no hagués estat possible. I gràcies també per donar-me la oportunitat de formar part d'aquesta gran Unitat de Malalties Neuromusculars. El que m'enduc del meu pas per Sant Pau no són només coneixements teòrics; aquí he après a treballar amb constància, rigor, a enfocar científicament les inquietuds mèdiques, a implicar-me. I és gràcies a tot això que ara puc ser aquí.

A la Gisela, per la teva grandíssima ajuda, la teva admirable paciència, i per tot el que m'has ensenyat. És evident que aquesta tesi te la dec en part a tu. Sóc molt afortunada de poder seguir treballant al teu cantó.

Al Jordi i el Ricard, per compartir amb mi els vostres coneixements. Per ensenyar-me a tractar amb pacients, a mirar-los a la cara encara que les notícies no siguin bones, a prendre l'estona necessària per explorar minuciosament. I per fer-me veure que l'atenció mèdica, la docència i la investigació poden ser compatibles, i totes elles de qualitat.

A l'Edu, per ajudar-me sempre que ho he necessitat, i per preocupar-te tant pels temes laborals com personals.

A Luis, por responder a mis llamadas de auxilio y no tener nunca un "no" por respuesta. Por tus grandes consejos. Y por que eres un modelo a seguir.

A Aída, por ser tan sincera en los inicios y por ser un pilar fundamental durante mi estancia en Sant Pau. Eres la mejor "becaria-mayor" que podría haber tenido.

A la Sonia, per les llargues hores passades juntes, compartint taula i lluitant contra l'spss. Una part d'aquesta tesi és també fruit teu. Mil gracias per ser com ets, per dir les coses tal com són, les bones i dolentes.

AGRADECIMIENTOS / AGRAÏMENTS

Al Xavi, Miquel, Ana, Fina, Esther, Bàrbara, Noemí, Cinta i Patri, per fer que al labo em senti com una més. A la Eugènia, per tot el que em vas ensenyar. Al Sebas i la Elena, perquè encara que hem coincidit poc, sou una gran companyia.

A la Mariví, el Cándido i la Yolanda, per la vostra inestimable ajuda.

A la família del Taulí, per fer-me descobrir el món de la patologia neuromuscular. Encara ara hi ha moments en que us trobo a faltar.

Al Jaume, per confiar cegament en mi ara fa dos anys. I per tenir sempre un moment per a donar un cop de mà.

A la Míriam i l'Ali, l'equipo Al, per la vostra bondat, per ajudar-me desinteressadament quan ho he necessitat i per escoltar-me sempre que ha calgut. Gràcies, noies, per fer que els dies passin més ràpids!

Al meu germà, per ser sempre allà, encara que no et facis notar.

Als meus pares, per confiar tant em mi, inclús més que jo mateixa. Per ajudar-me en tot, sempre, de forma incondicional.

Al Víctor, per fer-me tant feliç. I per Porto, i tot el que vindrà...

Ac:	Anticuerpo
AChR:	Receptor de acetilcolina
AIRE:	Autoimmune regulator
CG:	Centros germinales
CVF:	Capacidad vital forzada
ER:	Estimulación repetitiva
GWAS:	Genomewide association study
EAMG:	Miastenia Gravis autoinmune experimental
EoMG:	Early onset Miastenia Gravis / Miastenia gravis de debut temprano
HLA:	Human leukocyte antigen system
IgEV:	Immunoglobulinas endovenosas
IL:	Interleukina
ITMIG:	International Thymic Malignancy Interest Group
IOT:	Intubación orotraqueal
LoMG:	Late onset Miastenia Gravis / Miastenia Gravis de debut tardío
LRP4:	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4 / Proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
MG:	Miastenia Gravis
MGFA:	Miastenia Gravis Foundation of America
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIR:	Región inmunogénica mayor
miRNA:	MicroRNA
MUSK:	Kinasa específica del músculo
NK:	Células Natural Killer
NMD-ES:	Registro nacional de enfermedades neuromusculares en España
NFATc1:	Nuclear factor of activated T-Cells cytoplasmic 1
PIS:	Post-interventional Status
PLEX:	Plasmaféresis
RISC:	RNA-induced silencing complex
SFEMG:	Estudio electrofisiológico de fibra aislada
SNG:	Sonda nasogástrica
SRV:	Situaciones de riesgo vital
TLR:	Toll like receptor
TNF:	Factor de necrosis tumoral
Treg:	Células T reguladoras
VMNI:	Ventilación mecánica no invasiva

AGRADECIMIENTOS**ABREVIATURAS**

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DEFINICIÓN DE MIASTENIA GRAVIS	3
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	3
1.3. HETEROGENEIDAD	4
1.4. FISIOPATOLOGÍA	6
1.4.1. Bases fisiopatológicas de la MG	6
1.4.1.1. Factores predisponentes	7
Factores genéticos	7
Hormonas	7
Vitamina D	8
1.4.1.2. Factores desencadenantes	8
1.4.1.3. Desregulación inmune	8
1.4.2. Tipos de autoanticuerpos y mecanismos de acción	10
1.4.3. Implicación del timo en la patogénesis de la MG antiAChR+	16
1.5. CLÍNICA	18
1.5.1. Subtipos de Miastenia Gravis Autoinmune	20
1.5.2. Situaciones de Riesgo Vital - Crisis Miasténicas	23
1.6. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS ACTUALES	25
1.6.1. Técnicas neurofisiológicas	26
1.6.2. Test de edrofonio y test del hielo	27
1.6.3. Autoanticuerpos	28
1.6.4. Nuevos biomarcadores: MiRNAs	29
1.7. TRATAMIENTO	32
1.7.1. Tratamiento sintomático	33
1.7.2. Tratamiento inmunosupresor	33
1.7.3. Tratamiento inmunomodulador	36
1.7.4. Timectomía	37
1.7.5. Manejo de las Situaciones de Riesgo Vital	38
1.8. REGISTRO NMD-ES	38
1.9. BIBLIOGRAFÍA	40
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
3. TRABAJOS PUBLICADOS	55
ARTÍCULO 1: ANALYSIS OF SERUM MiRNA PROFILES OF MYASTHENIA GRAVIS PATIENTS	57
ARTÍCULO 2: MYASTHENIA GRAVIS: DESCRIPTIVE ANALYSIS OF LIFE-THREATENING EVENTS IN A RECENT NATIONWIDE REGISTRY	89
4. CONCLUSIONES FINALES	105

Introducción

1.1. DEFINICIÓN DE MIASTENIA GRAVIS

La Miastenia Gravis (MG) es una enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos frente a proteínas de la membrana post-sináptica de la unión neuromuscular¹. Se trata de una enfermedad muy heterogénea tanto desde el punto de vista clínico como fisiopatológico². Más del 80% de los pacientes afectados de MG presentan anticuerpos contra el receptor nicotínico de la acetilcolina (AChR)³. En el resto de pacientes pueden detectarse anticuerpos frente a la kinasa músculo específica (MUSK)⁴ o contra otras moléculas post-sinápticas, aunque existen pacientes seronegativos. En algunos casos la enfermedad aparece en el contexto de un tumor de la glándula tímica. Clínicamente los pacientes presentan fatigabilidad de la musculatura voluntaria que puede afectar de forma selectiva a los músculos oculares, o bien ser generalizada afectando diferentes grupos musculares (oculares, bulbares o de las extremidades). Cuando la afectación es severa y de predominio bulbar puede llegar a comportar una situación de riesgo vital para el paciente. El tratamiento de la MG se basa en la terapia inmunosupresora, especialmente la cortisona asociada o no a otros fármacos, la timentomía en algunos casos y el tratamiento sintomático con piridostigmina. Si la enfermedad es severa, puede además ser necesario el uso de terapias inmunomoduladoras con inmunoglobulinas endovenosas o plasmaféresis.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La MG es una patología poco frecuente, con una prevalencia estimada de 5-24/100.000 habitantes^{5,6}. La incidencia es muy variable, entre 1.7-28/1.000.000 habitantes por año según las diferentes poblaciones⁷⁻⁹. Las tasas de prevalencia e incidencia descritas en los estudios más recientes son mayores comparadas con las descripciones clásicas. En concreto, en los pacientes de edad más avanzada se ha señalado un aumento significativo de la incidencia en cada década a partir de los 65 años (**Figura 1**)^{8,9}. Este aumento en la incidencia en pacientes mayores puede deberse a un aumento en la esperanza de vida, una mayor conciencia de la enfermedad en este grupo de población y/o a una mejoría en las técnicas de diagnóstico^{8,9}.

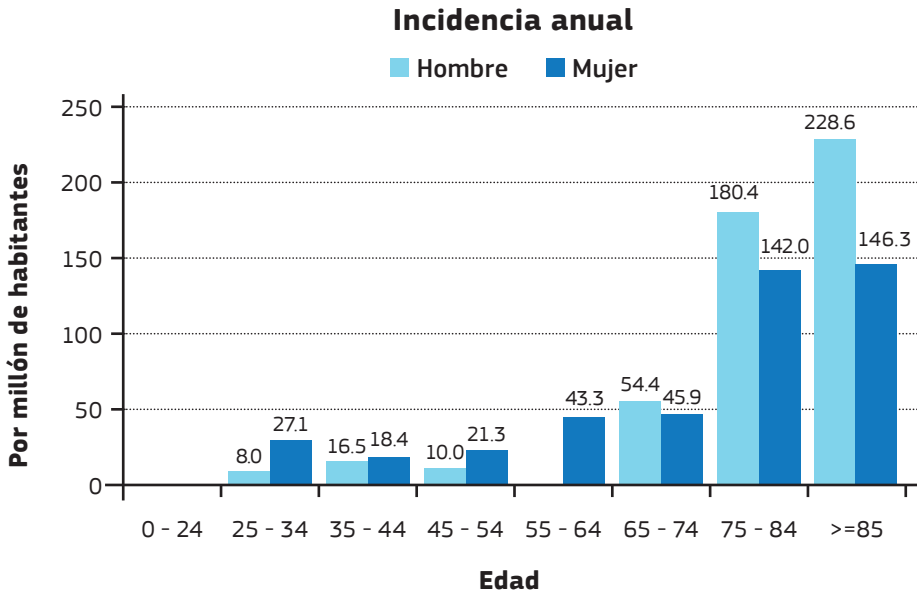


Figura 1: Aumento en la incidencia de MG a partir de los 65 años.
Adaptado de Aragonés et al, J Am Geriatr Soc 2014⁹.

1.3. HETEROGENEIDAD

La MG es una enfermedad heterogénea, tanto desde el punto de vista clínico como patogénico o de respuesta al tratamiento inmunosupresor^{2,10}.

Clínicamente los pacientes presentan fatigabilidad, entendida como la aparición de debilidad muscular después de realizar un ejercicio repetido y su recuperación con el reposo. En función del patrón preferente de debilidad muscular se clasifican en formas Oculares o bien Generalizadas¹⁰. En este último grupo, la afectación predomina principalmente en la musculatura de las extremidades (MG tipo A) o bien en la musculatura bulbar (MG tipo B). Según la distribución clínica y el grado de afectación, los pacientes se clasifican mediante la escala establecida por la Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA)¹¹.

La edad de debut de la enfermedad es muy variable. Clásicamente se consideraba una enfermedad de pacientes jóvenes, pero en los últimos años se ha observado un claro aumento de la incidencia de MG en edades avanzadas^{8,12,13}. Además es posible que en la población anciana esta enfermedad esté infradiagnosticada, debido errores en la

interpretación de la sintomatología o a limitaciones en la exploración^{12,14}. Los pacientes se clasifican en miastenia de inicio temprano (early onset myasthenia gravis - **EoMG**) cuando el debut de la enfermedad ocurre antes de los 50 años, o bien en debut tardío si ésta aparece a los 50 años o más (late onset myasthenia gravis - **LoMG**). Aunque la MG puede aparecer a cualquier edad y en ambos sexos, la enfermedad se comporta de forma bimodal con un pico de incidencia entre mujeres jóvenes y otro pico entre hombres mayores de 50 años, presentando ambos sexos esta distribución bimodal (*Figura 2*)^{8,10}.

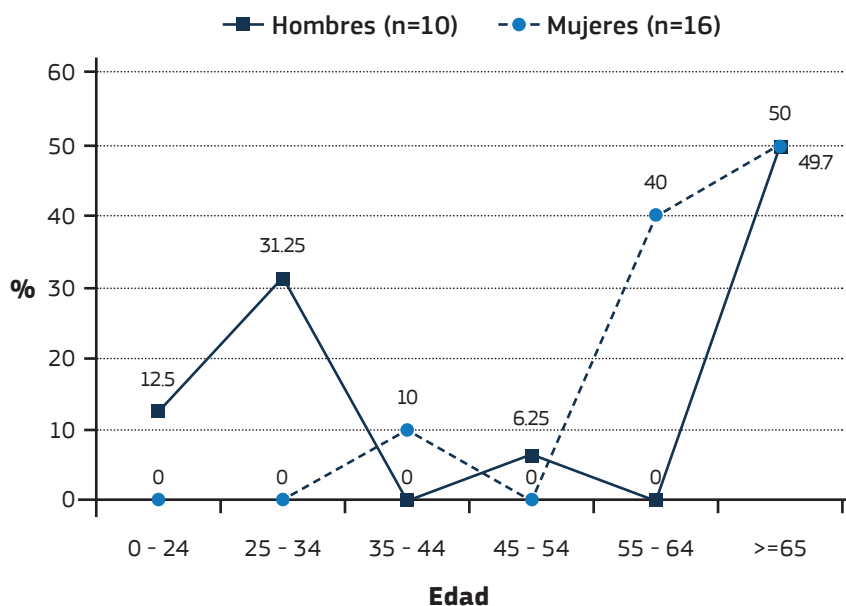


Figura 2: Edad de presentación de la MG. Nuevos casos diagnosticados de MG según edad y sexo (1991-2000). Adaptado de Aragonés et al, Neurology 2003⁸.

Inmunológicamente, no todos los pacientes presentan el mismo perfil de autoanticuerpos y, por tanto, tampoco comparten el mismo mecanismo fisiopatológico. En la mayoría de pacientes existen anticuerpos contra el receptor nicotínico de la acetilcolina (Ac antiAChR)¹⁵. Los anticuerpos frente a la kinasa músculo específica (Ac antiMUSK) se encuentran en aproximadamente la mitad de los pacientes sin anticuerpos antiAChR, y clásicamente se han relacionado con una afectación clínica de predominio bulbar^{4,16}. El resto de anticuerpos y sus mecanismos fisiopatológicos se describen en el siguiente apartado.

1 ■ INTRODUCCIÓN

Las formas de MG con anticuerpos antiAChR se relacionan con **patología tímica**, lo que tiene también implicaciones en el mecanismo fisiopatológico^{17,18}. Con relativa frecuencia, los pacientes EoMG con una forma generalizada de MG y Ac antiAChR asocian una hiperplasia tímica. En aproximadamente el 10% de los casos la MG es una enfermedad que aparece en el contexto de un timoma, un tumor epitelial de la glándula tímica. La MG causada por Ac antiMUSK, en cambio, no se considera asociada a patología tímica¹⁹. La timectomía está indicada en los pacientes con MG asociada a timoma, y es una opción terapéutica en los casos EoMG con MG generalizada, aunque su utilidad es debatida^{20,21}.

La respuesta a las diferentes **opciones terapéuticas** es muy variable y heterogénea². La gran mayoría de pacientes responden al tratamiento con corticoides, aunque algunos son refractarios a éstos o presentan una mejoría clínica escasa o insuficiente. En estos casos deben usarse otros fármacos inmunosupresores, ya sea solos o en combinación con los corticoides. La respuesta al resto de inmunosupresores es también muy variable, y en muchos casos no se dispone de ningún marcador que permita prever la respuesta a una determinada estrategia terapéutica. En las exacerbaciones clínicas o en las situaciones de riesgo vital con compromiso de la musculatura bulbar (estadio MGFA IVB o V) pueden usarse terapias inmunomoduladoras como las IgEV o PLEX, aunque la respuesta a estos regímenes terapéuticos es también variable.

1.4. FISIOPATOLOGÍA

1.4.1. Bases fisiopatológicas de la MG

La MG es una enfermedad multifactorial derivada de una combinación de factores genéticos y ambientales. Como otras enfermedades autoinmunes, la MG se desarrolla en base a unos factores predisponentes determinados sobre los que actúan otros factores externos que activan los mecanismos pro-inflamatorios y que finalmente originan la respuesta autoinmune^{22,23}. Esta respuesta es órgano-específica y se produce a nivel post-sináptico de la placa motora, reduciendo la eficacia de la transmisión neuromuscular y provocando la debilidad muscular.

1.4.1.1. Factores predisponentes

Factores genéticos

Aunque la MG autoinmune no es una enfermedad con herencia mendeliana, existe una clara influencia de algunos factores genéticos para su desarrollo. La más evidente es la asociación de las formas EoMG e hiperplasia folicular tímica con los haplotipos HLA-B8 y DR3 del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que a su vez se correlaciona con otras enfermedades autoinmunes²⁴⁻²⁶. Los casos de LoMG se asocian a HLA-DR2 y B7, aunque de forma menos consistente²⁷. Existen otras asociaciones descritas en población japonesa y china con MG (HLA-DR9, HLA-BW46)²⁸, y también se ha descrito una asociación en MG antiMUSK con DR14-DQ5²⁹. Además del MHC, la MG antiAChR se asocia con otros genes. Mediante estudios de polimorfismos se ha detectado una asociación con variantes alélicas del locus CHRNA1 (α -subunit of muscle nicotinic acetylcholine receptor), PTPN22 (tyrosine phosphate non-receptor 22), FCGR2A (type 2A low affinity receptor for IgG), CTLA4 (cytotoxic T cell late antigen 4) y FoxP3 (Fork head/winged-helix transcription factor 3)^{26,30,31}. Un estudio de asociación del genoma completo (GWAS-Genomewide association study) en el norte de Europa encontró que TNIP1 (TNF-alfa-induced protein 3 interacting protein 1) se asociaba a formas EoMG³². El TNIP1 ya había sido señalado como alelo de riesgo en otras enfermedades autoinmunes y ha sido implicado en enfermedades inflamatorias crónicas. Este mismo estudio confirmó la asociación ya conocida de HLA-B8 y PTPN22 con EoMG.

Hormonas

Las hormonas sexuales, principalmente los estrógenos aunque también la testosterona y progesterona, influyen sobre sistema inmune. Los estrógenos están implicados en procesos de maduración y selección de células B, en la secreción de anticuerpos, y tienen un papel destacado en el desarrollo y mantenimiento del timo, y por tanto en la formación de células CD4/CD8³³. Puesto que el género es variable en los diferentes subgrupos de MG, es probable que las hormonas sexuales tengan un papel en la fisiopatología de la enfermedad. En concreto, la EoMG se relaciona con la hiperplasia tímica y con el sexo femenino, y la MG con Ac anti-MUSK tiene también un predominio en mujeres. Además, se conoce que el embarazo y el postparto pueden

1 ■ INTRODUCCIÓN

influir en la clínica³⁴. Un estudio demostró que existe una desregulación en la expresión de los receptores de estrógeno en el timo y en linfocitos de pacientes con MG, lo que podría contribuir a generar o perpetuar la respuesta autoinmune³⁵. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios para esclarecer el papel de las hormonas en la MG²².

Vitamina D

Los niveles bajos de Vitamina D (VitD) han sido descritos como factor de riesgo en diversas enfermedades autoinmunes^{36,37}, aunque en la MG existía escasa información sobre su relación con la VitD. Recientemente, un estudio ha detectado niveles más bajos de VitD en pacientes con MG comparados con controles, y que clínicamente algunos de estos pacientes mejoraban al administrar suplementos de esta vitamina³⁸.

1.4.1.2. Factores desencadenantes

Los principales factores desencadenantes de la MG son infecciones o fármacos. En concreto el virus Ebstein-Barr (VEB) ha sido relacionado con la MG, al encontrarse células B con signos de infección por VEB en timos hiperplásicos de pacientes pero no en controles^{23,39}. Otros estudios han postulado la implicación de otros virus como el citomegalovirus (CMV) o el West-Nile virus en la MG⁴⁰. Sin embargo, el papel de estos virus en la patogénesis de la MG es controvertida. Los fármacos más comúnmente señalados como posibles desencadenantes son la D-penicilamina y los interferones, aunque el mecanismo por el que podrían inducir la enfermedad no está bien establecido⁴¹.

1.4.1.3. Desregulación inmune

Los mecanismos propuestos que finalmente dan lugar a la formación de autoanticuerpos incluyen errores en la presentación de antígenos o reconocimiento, tolerancia hacia los propios antígenos y desregulación de la proliferación/apoptosis de las células inmunes^{22,42}.

La producción de autoanticuerpos en la MG es un proceso dependiente de células T. El MHC juega un papel importante en la MG, al presentar péptidos del AChR de las células

presentadores de antígenos a los linfocitos Th. Como ya se ha comentado, variaciones en el MHC se han relacionado con diversos subgrupos de MG. Algunas de las citoquinas secretadas por estos Th están implicadas en la desregulación inmune de la enfermedad⁴². En concreto, el TNF- α se encuentra elevado en el timo, los CD4 y el suero de pacientes con MG, lo que sugiere una sobreproducción crónica de esta citoquina pro-inflamatoria⁴³. Los Th son esenciales para la activación de células B y la síntesis final de inmunoglobulinas específicas, lo que finalmente dará lugar a los síntomas de la enfermedad.

Las **células reguladoras T (Treg)** también están implicadas en la patogénesis de la MG, al ser necesarias para detectar aquellas células autoreactivas³⁷. Estas células Treg son CD4 que co-expresan CD25 y FoxP3, un factor de transcripción esencial para su función reguladora, y se encuentran en el timo y órganos linfoides periféricos. Algunos polimorfismos de FoxP3 se han visto asociados con la MG⁴⁴. Además, los Tregs en la MG son funcionalmente defectuosos^{43,45,46}. Sin embargo, existen dudas sobre si esta alteración de los Tregs es un factor pre-existente que predisponente a la enfermedad, o bien es consecuencia de la propia inflamación que altera la función de los Tregs^{41,47}.

La **inmunidad innata** es la primera línea de defensa ante patógenos, aunque también puede verse implicada en la inducción y perpetuación de determinadas enfermedades autoinmunes⁴⁸. Estudios recientes han demostrado que la expresión de TLR4 (Toll-like receptor 4) se encuentra incrementada en las células epiteliales tímicas de pacientes con MG, y que los niveles de TLR9 en células mononucleares de sangre periférica se relacionan con la gravedad clínica^{49,50}. En un modelo animal se ha evidenciado que la activación de TLR3 aumenta la expresión de α AChR de las células epiteliales tímicas, y que esto da lugar a la aparición de anticuerpos antiAChR y debilidad⁵¹. Sin embargo, su papel exacto en la patogénesis de la enfermedad aún debe ser definido.

1.4.2. Tipos de autoanticuerpos y mecanismos de acción

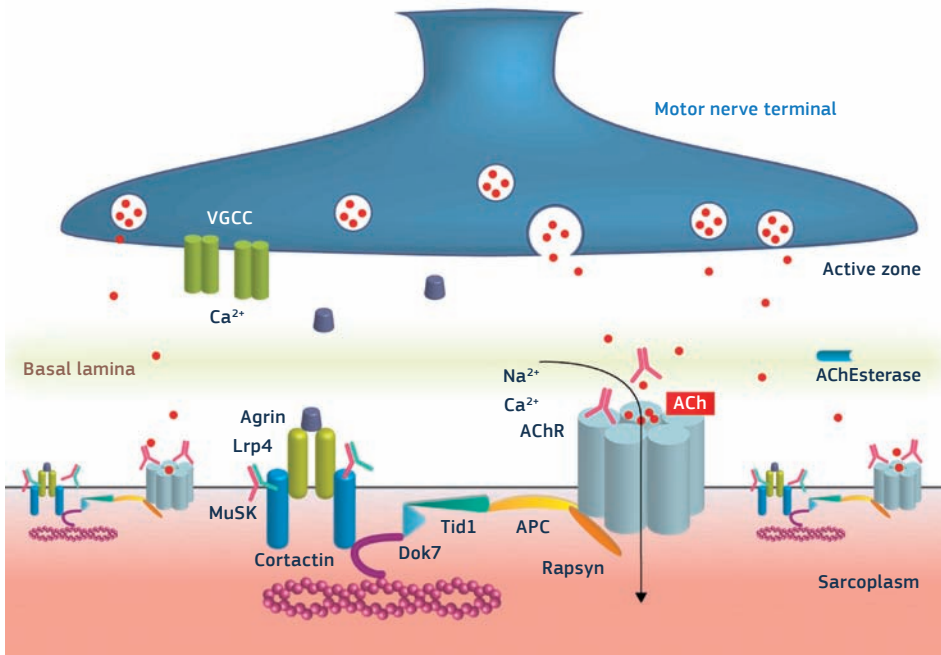


Figura 3: Esquema de la unión neuromuscular en el que se detalla la relación entre el Receptor de Acetilcolina y las proteínas Agrina, LRP4, MUSK y Cortactin

© Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

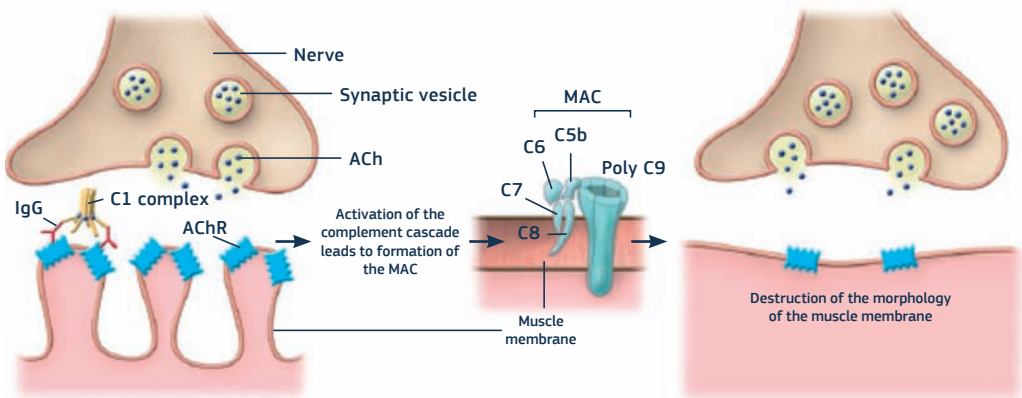
Los anticuerpos anti-receptor nicotínico de acetilcolina (Ac antiAChR) son moléculas policlonales de clase IgG1 o IgG3, que varían en su composición de cadenas ligeras y que identifican un repertorio variable de epítomos en cada paciente, con una afinidad y especificidad también variable⁵²⁻⁵⁶. Estos anticuerpos se encuentran en más del 80% de pacientes con MG generalizada, y se ha demostrado, en diferentes estudios, que son patogénicos^{3,15,57,58}.

Los receptores nicotínicos de la ACh son canales compuestos por 5 subunidades (2 α 3 β δ en adultos) que se encuentran en la membrana post-sináptica de la unión neuromuscular. Cuando la ACh se une a las subunidades alfa, el canal modifica su conformación y da lugar a su apertura, lo que permite la entrada de iones de Na⁺ generando un potencial de acción que finalmente origina la contracción muscular²² (**Figura 3**).

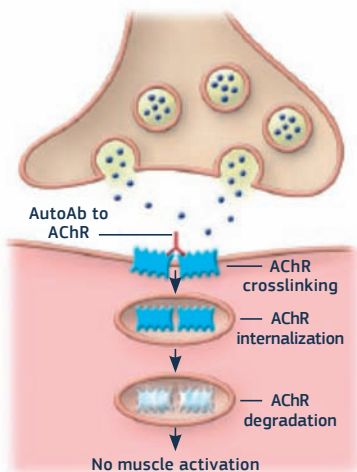
Los Ac antiAChR pueden alterar la transmisión neuromuscular por diferentes mecanismos:

- 1) Activan el complemento, ocasionando una destrucción de la superficie post-sináptica. Éste se postula como el mecanismo patogénico más agresivo para la placa motora ⁵⁹⁻⁶¹.
- 2) Promueven la endocitosis de los AChR y aceleran su degradación, mediante la unión de anticuerpos bivalentes a dos AChR distintos (modulación antigénica) ^{62,63}.
- 3) Bloquean el sitio de unión de los receptores de ACh, interfiriendo directamente con el canal iónico y alterando su función ^{56,64,65} (*Figura 4*).

A. Complement binding and activation at the NMJ



B. Antigenic modulation



C. Functional AChR block

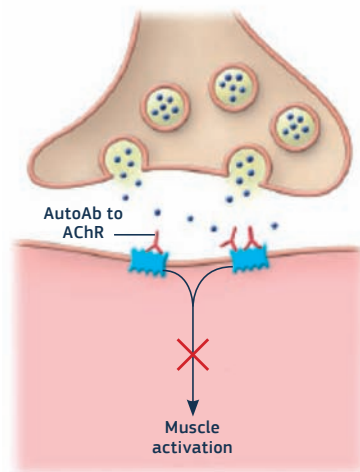


Figura 4: Mecanismos de acción de los Ac antiAChR.

- A) Activación de la cascada del complemento. B) Modulación antigénica.
C) Bloqueo funcional de los receptores. Conti-Fine et al, J Clin Invest 2006 ⁶⁵.

1 ■ INTRODUCCIÓN

El epítopo al que se unen los Ac antiAChR es también variable. La mayoría de los antiAChR reconocen epítopos de la “región inmunogénica mayor” (MIR) de la subunidad alfa del receptor. Ésta región es altamente inmunogénica dada su estructura de aminoácidos y su localización fácilmente asequible por los anticuerpos. Además, su localización en zonas con alta densidad de receptores de ACh permite que un mismo anticuerpo se una al epítopo correspondiente en dos AChR diferentes (“cross-linking”), produciéndose así una señal de endocitosis y degradación de estos receptores⁶⁶⁻⁶⁸.

En general los títulos de IgG antiAChR totales no se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, de forma que un mayor título de anticuerpos no necesariamente indica un estadio más grave^{15,71}. Esto se ha atribuido a la diferente afinidad de los Ac y a diferencias funcionales al bloquear o degradar los AChR, y probablemente también al repertorio de subunidades IgG de cada paciente. Sin embargo, un trabajo demostró una relación significativa entre los títulos de Ac contra la MIR y la clínica⁷². Además, algunos estudios señalan que puede existir relación entre la variación del título de anticuerpos en un mismo paciente antes y después de recibir un tratamiento inmunosupresor^{69,70,73}.

En aproximadamente la mitad de los pacientes seronegativos para Ac antiAChR pueden detectarse **anticuerpos contra la kinasa músculo específica (Ac antiMUSK)**^{4,74}. El mecanismo de acción de estos anticuerpos es diferente al de los Ac antiAChR. Los Ac antiMUSK son de la clase IgG4 y, a diferencia de los antiAChR, no pueden activar el complemento ni producir endocitosis⁷⁵⁻⁷⁷. Los MUSK son receptores de la tirosin-kinasa esenciales para la diferenciación sináptica y su mantenimiento⁷⁸ (**Figura 5**). Cuando la agrina se libera en la unión neuromuscular, se une a la proteína post-sináptica LRP4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4), quien a su vez se une a MUSK induciendo su fosforilación⁷⁹. Una vez MUSK está activado, se inicia una cascada de señales que promueve la agrupación de los AChR y la activación de otras moléculas de señal esenciales para la sinapsis. Además, MUSK se encarga de agrupar a las moléculas de LRP4, las cuales activan una vía retrógrada para la diferenciación pre-sináptica⁸⁰. Los Ac antiMUSK

actúan inhibiendo la unión entre LRP4-MUSK, y por tanto bloqueando la fosforilación de MUSK estimulada por Agrina. Así, el mecanismo patogénico por el que se producirían los síntomas miasténicos, no es una depleción en el número de moléculas MUSK, ni tampoco la dimerización de estas moléculas como ocurre con los Ac antiAChR, sino una pérdida de función de MUSK y la cascada de eventos posterior a su fosforilación^{76,77}.

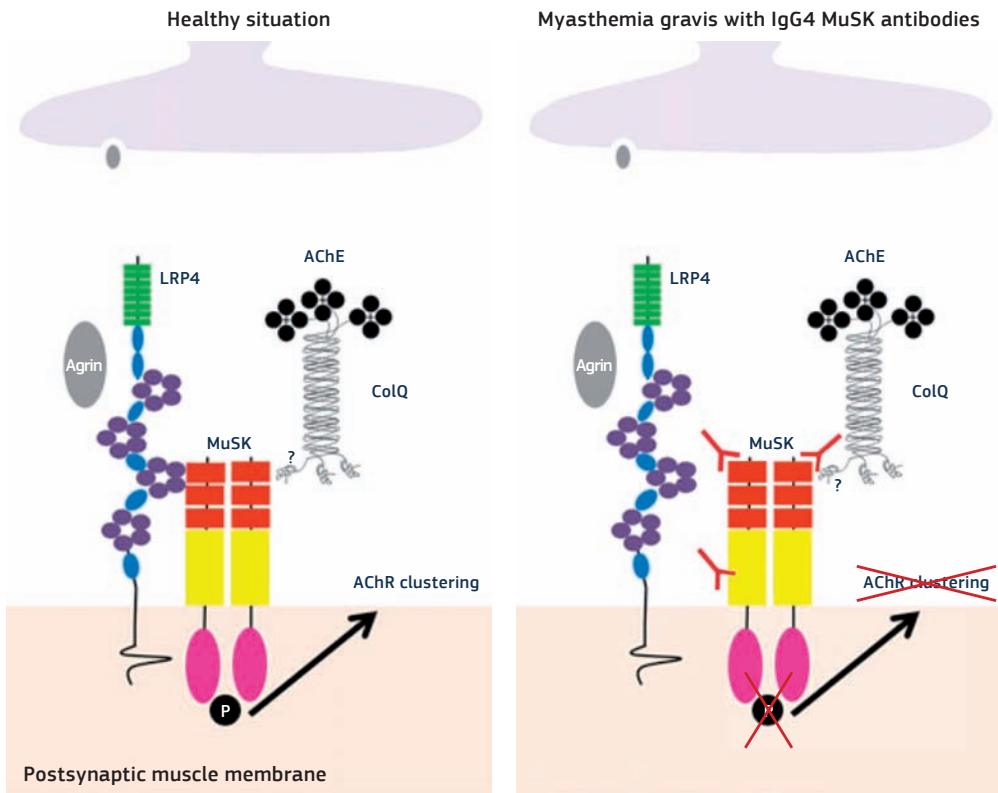


Figura 5: Los MUSK son antígenos proteicos transmembrana esenciales para el mantenimiento de la unión neuromuscular, al promover la agrupación de los AChR. Los anticuerpos IgG4, causantes de la enfermedad, no destruyen MuSK sino que inhiben su función. Huijbers et al, Eur J Neurol 2015⁷⁷.

Diferentes estudios han demostrado que existe una relación entre el título de Ac antiMUSK con el estadio clínico en la MG, a diferencia de los Ac antiAChR^{75,81}. Otra peculiaridad es que los pacientes con Ac antiMUSK presentan una clínica predominantemente bulbar con un perfil de respuesta específico ante determinados fármacos^{16,82-84}.

1 ■ INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha descrito la presencia de otros autoanticuerpos en pacientes con MG sin anticuerpos antiAChR ni antiMUSK. Los **anticuerpos frente a la proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (Ac antiLRP4)**, descritos por primera vez en el 2011, son anticuerpos del tipo IgG1 o IgG2 que se postula que actúan por dos mecanismos: a) promoviendo la endocitosis de LRP4 y alterando la vía de la agrina-LRP4-MUSK (**Figura 6**), y b) activando complemento y la lisis celular⁸⁵⁻⁸⁸. La prevalencia de estos anticuerpos en estudios previos es muy variable, entre 2-50%, lo que puede ser debido al limitado número de pacientes incluidos y los distintos criterios de inclusión, a factores étnicos o muy probablemente a diferencias en las técnicas de detección empleadas⁸⁵⁻⁸⁸. Aunque estos Ac antiLRP4 han sido descritos principalmente en pacientes seronegativos para AChR o MUSK, existen algunos pacientes doble positivos LRP4-AChR o LRP4-MUSK⁸⁸. Además, estos anticuerpos no son completamente específicos de MG, puesto que también se han detectado en pacientes con otras enfermedades inmunomediadas como el Lambert-Eaton, la neuromielitis óptica o la esclerosis múltiple, y en la esclerosis lateral amiotrófica^{85,86,88}.

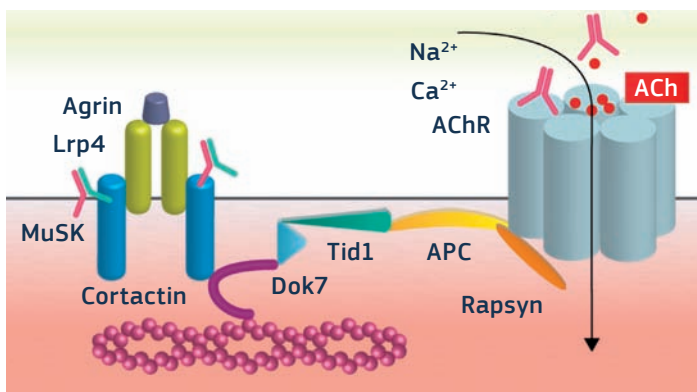


Figura 6: LRP4 se expresa en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular. Es un receptor para la agrina liberada de la terminal nerviosa, y activa MUSK. Tiene un papel esencial en mantener la función de los AChR.

© Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Los pacientes triple seronegativos (AChR-, MUSK-, LRP4-) representan entre un 2-5% del total de pacientes. Probablemente parte de estos pacientes tienen en realidad Ac contra AChR de muy baja afinidad, por lo que las técnicas diagnósticas usadas actualmente

carecen de sensibilidad suficiente para detectarlos. Estos **Ac antiAChR de baja afinidad** son de clase IgG1 y se pueden detectar mediante una técnica de quintuple trasfección con 4 unidades del AChR y rapsina, aunque esta técnica no está comercializada^{89,90}. Un estudio reciente demostró la presencia de estos anticuerpos de baja afinidad en un 38% de pacientes previamente catalogados como seronegativos⁹¹. También se ha postulado que los Ac antiAChR y antiMUSK pueden permanecer ligados a su antígeno en la unión neuromuscular, lo que dificultaría su detección circulando en sangre periférica⁹².

El resto de pacientes triple seronegativos probablemente tenga otro tipo de autoanticuerpos contra proteínas post-sinápticas. Recientemente se ha descrito la presencia de **anticuerpos anti-Cortactina** en algunos pacientes con MG, aunque su patogenicidad no ha sido bien establecida⁹³. Estos Ac no son específicos de esta enfermedad ya que también se han detectado en miopatías inflamatorias y en otros procesos inmunomediados⁹⁴, pero su detección en casos de MG seronegativa puede ayudar al diagnóstico de enfermedad autoinmune y apoyar el uso de terapias inmunosupresoras. En los últimos años también se ha descrito la presencia de **anticuerpos anti-Agrina** en pacientes triple seronegativos o con otros autoanticuerpos simultáneos que probablemente actúen sobre la vía agrina-LRP4-MUSK, aunque su patogenicidad y características clínicas están aún por definir^{95,96}.

Paralelamente a la presencia de los anticuerpos antiAChR, antiMUSK u otros, los pacientes pueden presentar **anticuerpos anti-músculo estriado**. Estos anticuerpos están sobretudo dirigidos contra la titina o el receptor de la ryanodina, y con menor frecuencia pueden unirse a otras proteínas como la miosina, tropomiosina, troponina, alfa-actinina y actina⁹⁷⁻⁹⁹. Estos anticuerpos no son patogénicos, pero su presencia sugiere diferencias en la fisiopatología de la enfermedad ya que son característicos de pacientes con miastenia de inicio tardío (LoMG) o de miastenia asociada a timoma¹⁰⁰. Por ejemplo, los anticuerpos contra el receptor de la ryanodina se han relacionado con la presencia de timoma, y su detección confiere un 70% de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de MG asociada a timoma¹⁰¹.

1.4.3. Implicación del timo en la patogénesis de la MG antiAChR+

El timo es el órgano principal del sistema inmune, esencial para la diferenciación de las células T y para asegurar una tolerancia central. En él, las células T autoreactivas son eliminadas mediante mecanismos de selección negativa, mientras que las células T con autotolerancia, capaces de reconocer antígenos extraños a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), continúan su diferenciación.

El timo desempeña un papel fundamental en la inmunopatogénesis de la Miastenia Gravis, aunque su implicación es variable en los diferentes subtipos de pacientes¹⁷. Un 10% de los pacientes con MG y Ac antiAChR presentan un tumor tímico, y en hasta el 65% de pacientes con EoMG se detecta una hiperplasia tímica. A pesar de que se ha descrito algún caso anecdótico de timoma en pacientes antiMUSK o seronegativos, se debate su relación fisiopatológica.

EoMG con Ac antiAChR

Hasta el 65% de pacientes EoMG presentan alteraciones tímicas en forma de hiperplasia folicular linfoide¹⁰². Esta hiperplasia se caracteriza por la presencia de espacios perivasculares expandidos que contienen infiltrados linfoides de células T y células B formando centros germinales (CG), y es en estos CG es donde tiene lugar la producción intratímica de Ac antiAChR. Aunque el mecanismo de activación de los CG no está bien establecido, se ha propuesto el siguiente modelo: después de un desencadenante inicial no conocido, se activan algunas células Th que reconocen subunidades del AChR expresadas en células epiteliales medulares. Estas células Th promueven la formación de Ac que atacan las células mioideas vecinas (que semejan células musculares y expresan el AChR nativo) y activan complemento, con la subsecuente liberación de complejos AChR/anticuerpo. Estos complejos antígeno/anticuerpo son un potente estímulo para activar a las células presentadoras de antígenos, inducir la formación de centros germinales y fomentar la diversificación de los autoanticuerpos, dando lugar a la enfermedad. Posteriormente, este proceso iniciado a nivel intra-tímico puede perpetuarse en los órganos linfáticos periféricos, manteniendo así la autoinmunidad^{17,103}.

MG asociada a timoma

Como ya se ha comentado, un 10% de pacientes afectados de MG presentan un tumor de la glándula tímica^{17,102}. A su vez, el 20-50% de pacientes con timoma se encuentran afectados de MG, y existe un 20-25% de pacientes con timoma en los que pueden detectarse Ac antiAChR o anti-músculo estriado sin que presenten síntomas de la enfermedad¹⁰⁴.

Los timomas son tumores de células epiteliales tímicas¹⁰⁵. En función del contenido linfocítico y el tipo de células epiteliales se clasifican histológicamente en A, AB, B1, B2 y B3 según la clasificación de la WHO (*Tabla 1*), que fue revisada recientemente por el grupo de estudio ITMIG (International Thymic Malignancy Interest Group)¹⁰⁶.

Tabla 1: Clasificación de los tumores tímicos según la “World Health Organization” (WHO), revisado por ITMIG¹⁰⁶

Tipo	Definición anatomopatológica de los tumores tímicos
A	Tumor compuesto por células epiteliales tímicas fusiformes u ovaladas sin atípia y sin presencia de linfocitos.
AB	Tumor en el que existen focos con las características del tumor tipo “A” mezclados con focos ricos en linfocitos no neoplásicos, y las células epiteliales expresan tanto marcadores corticales como medulares.
B1	Tumor que se asemeja al timo funcional normal, con extensas áreas de apariencia indistinguible al cortex tímico e islotes medulares.
B2	Tumor compuesto por células epiteliales dispersas entre una gran cantidad de linfocitos no neoplásicos.
B3	Tumor compuesto predominantemente de células epiteliales sin atípia o con mínima atípida, mezcladas con escasos linfocitos.
C	Carcinoma tímico.

En timos normales, los linfocitos T sufren una selección positiva mediante el reconocimiento de antígenos asociados al MHC en el cortex tímico, y una selección negativa de las células que reconocen antígenos propios y que deben ser eliminadas. Esta selección negativa está mediada por las células epiteliales medulares que expresan AIRE (regulador autoinmune) y por células dendríticas presentadoras de antígenos. En los timomas existe una pérdida de la región medular y una ausencia de células mioides que expresan AChR, no se expresa AIRE, y por tanto no se realiza una correcta selección negativa¹⁰⁷. Además, las células epiteliales neoplásicas pueden expresar epítopos de subunidades del receptor de ACh, de la titina y

1 ■ INTRODUCCIÓN

del receptor de la ryanodina, lo que distorsiona la selección positiva de células T autoreactivas para su supervivencia. Una vez estas células T autoreactivas se exportan fuera del timo, activan la producción de autoanticuerpos mediante mecanismos no bien definidos. La especificidad por la que estas células T atacan de forma preferente al AChR puede deberse a la ausencia de células mioides en los timomas con el consecuente error en la selección negativa de los autoantígenos musculares que expresan, en especial el AChR^{17,18}.

1.5. CLÍNICA

La característica común en todos los pacientes con MG es la presencia de fatigabilidad muscular. Se define fatigabilidad como la aparición de debilidad muscular después de realizar un ejercicio, que mejora con el reposo (*Figura 7*). Esta debilidad fluctuante puede afectar a cualquier músculo estriado tanto a nivel de los ojos, la musculatura bulbar, las extremidades o incluso en tronco, y puede manifestarse de forma variable en cada localización.

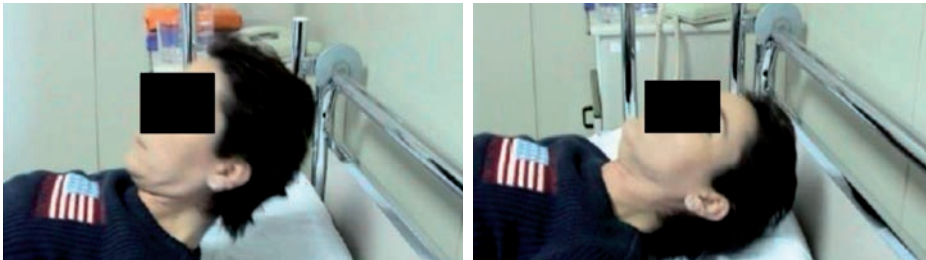


Figura 7: Fatigabilidad cervical con el ejercicio.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

La **afectación ocular** es la forma más frecuente de inicio, ya sea en forma de grado variable de ptosis o diplopía, con o sin oftalmoparesia¹⁰⁸. Aproximadamente el 80-85% de pacientes debutan con clínica ocular, aunque finalmente menos del 20% de pacientes presentarán una forma ocular pura (es decir, con debilidad exclusiva de la musculatura extraocular y/o ptosis)¹⁰⁹. La **afectación bulbar** aparece como síntoma inicial en el 15% de casos, en forma de disfagia, disartria, disfonía, debilidad mandibular, y en casos menos frecuentes en forma de disnea o incluso insuficiencia respiratoria. En ocasiones más raras el debut puede producirse en forma de **debilidad muscular de cinturas, debilidad distal** o incluso una **debilidad focal** de un grupo muscular concreto¹⁰.

La **evolución** clínica es también muy variable. Los pacientes pueden experimentar periodos de empeoramiento clínico, que pueden estar desencadenados por infecciones, estrés emocional, cirugías, o diversos fármacos^{2,10,110-112} (**Tabla 2 y 3**). La mayoría de pacientes llegan al acmé clínico durante los 2 primeros años de enfermedad, aunque se han descrito casos mucho más tardíos¹⁰⁹. Aquellos pacientes con un debut ocular que posteriormente generalizan también suelen hacerlo durante los 2 primeros años de la enfermedad^{108,109}. Las remisiones espontáneas son raras, aunque han sido descritas en ocasiones.

Tabla 2: Factores relacionados con exacerbaciones clínicas en pacientes con MG^{2,10,110-112}

Factores relacionados con exacerbaciones clínicas en pacientes con MG
Infecciones
Fármacos *
Retirada/abandono del tratamiento inmunosupresor
Estrés emocional
Cirugía
Temperaturas extremas
Vacunas
Hipertiroidismo

Tabla 3: *Fármacos que pueden causar exacerbaciones clínicas en pacientes con MG

Fármacos que pueden causar exacerbaciones clínicas en pacientes con MG	
Fármacos contraindicados en la MG	D penicilamina
Fármacos que se pueden usar con precaución	Telitromicina
Fármacos que aumentan la debilidad en algunos pacientes	Curare y derivados Toxina botulínica Aminoglucosidos (Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Estreptomina, Tobramicina) Macrólidos (Eritromicina, Azitromicina) Fluoroquinolonas (Ciprofloxacino, Levofloxacino, Norfloxacino) Quinina, Procainamida Interferón-alfa Sales de magnesio (suplemento endovenoso de magnesio)
Fármacos que pueden aumentar la debilidad en algunos pacientes	Antagonistas del calcio Betabloqueantes Litio Contraste yodado Estatinas (relación causal es dudosa debido su uso extendido)

En función de la manifestación clínica predominante, los pacientes se clasifican en 5 estadios según la **Myasthania Gravis Foundation of America (MGFA)** (*Tabla 4*)¹¹. El estadio I hace referencia a una afectación puramente ocular a lo largo de toda la enfermedad. El resto de estadios hacen referencia a formas generalizadas de la enfermedad, clasificándose de II – IV según su gravedad. Cada grado se subdivide a su vez en “A” si la afectación es predominante en las extremidades, o en “B” si predomina la clínica bulbar. El estadio V hace referencia a aquellos pacientes que se encuentran intubados en situación de crisis miasténica.

Tabla 4: Clasificación clínica de la Miastenia Gravis según la MGFA¹¹

Clasificación clínica de la Miastenia Gravis según la MGFA	
Clase I	Debilidad de cualquier músculo ocular Puede tener debilidad para la oclusión de los párpados No existe debilidad del resto de musculatura
Clase II	Debilidad generalizada leve
Ila	La debilidad predomina en musculatura de extremidades y/o axial
Iib	La debilidad predomina en musculatura bulbar (orofaríngea, respiratoria)
Clase III	Debilidad generalizada moderada
IIia	La debilidad predomina en musculatura de extremidades y/o axial
IIib	La debilidad predomina en musculatura bulbar (orofaríngea, respiratoria)
Clase III	Debilidad generalizada moderada
IIia	La debilidad predomina en musculatura de extremidades y/o axial
IIib	La debilidad predomina en musculatura bulbar (orofaríngea, respiratoria)
Clase IV	Debilidad generalizada severa
IVa	La debilidad predomina en musculatura de extremidades y/o axial
IVb	La debilidad predomina en musculatura bulbar (orofaríngea, respiratoria). Puede requerir el uso de sonda nasogástrica.
Clase V	Crisis miasténica El paciente requiere intubación orotraqueal con o sin ventilación mecánica asistida.

1.5.1. Subtipos de Miastenia Gravis Autoinmune

En función de la edad de presentación, tipo de anticuerpos y su asociación con patología tiroidea, se definen diferentes subtipos de pacientes con MG^{10,113}. La caracterización de estos subtipos clínicos es indispensable para asegurar un manejo óptimo de la enfermedad en cada paciente.

Los pacientes con anticuerpos **antiAChR** se clasifican en 3 grupos^{2,10,113}: **A)** Los **EoMG (Early onset MG)** son pacientes con un debut de la enfermedad antes de los 50 años y suelen ser predominantemente mujeres. Con frecuencia estos pacientes presentan una hiperplasia tímica, y pueden asociar otras patologías autoinmunes concomitantes, como tiroiditis autoinmune. **B)** Los **LoMG (Late onset MG)** debutan a partir de los 50 años, con un predominio de sexo masculino, y no asocian con igual frecuencia patología tímica. Simultáneamente a los Ac antiAChR pueden presentar otros anticuerpos anti-músculo estriado como los anti-titina (**Figura 8**). **C)** En el grupo de pacientes con **MG asociada a timoma** no existen diferencias significativas de sexo ni edad. Se postula que estos pacientes presentan un título de anticuerpos mayor y un fenotipo clínico más severo, aunque esto no ha sido demostrado^{114,115}.



Figura 8: Paciente con LoMG. Obsérvese la importante debilidad de la musculatura cervical con uso de musculatura accesoria

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

La **Miastenia Ocular** ocurre en menos del 20% de los casos y se caracteriza por una afectación exclusiva de la musculatura extraocular y palpebral¹⁰⁹. Su inmunopatogenia es probablemente similar a la miastenia generalizada, aunque existe un mayor número de pacientes seronegativos (hasta el 50%)¹¹³. Los músculos extraoculares presentan unas peculiaridades estructurales, funcionales y bioquímicas que les confieren una mayor susceptibilidad para verse afectados en la MG. Entre sus características morfológicas destacan unas hendiduras post-sinápticas menos prominentes con menos cantidad de AChR y coexpresión de formas fetales y adultas del receptor, aunque probablemente esto último sea

1 ■ INTRODUCCIÓN

de poca relevancia. A nivel funcional presentan unidades motoras más pequeñas (menos fibras musculares por neurona motora) con frecuencias de disparo más altas, lo que les hace más propensas a un fracaso en la transmisión neuromuscular¹¹⁶. Otro dato relevante es que existe una menor capacidad de inhibir el complemento en la placa motora de estos músculos, siendo así más susceptibles a este tipo de agresión¹¹⁷.

Los pacientes con Ac **antiMUSK** suelen presentar un debut de la enfermedad a edades tempranas, con un predominio en mujeres. Aunque clínicamente pueden superponerse al fenotipo de pacientes con Ac antiAChR, los pacientes con Ac antiMUSK suelen presentar de forma característica mayor implicación de musculatura bulbar con atrofia establecida, incluso sin afectación ocular (**Figura 9**)^{16,82}. Este grupo de pacientes no suelen presentar patología tímica asociada^{19,118}.



Figura 9: Paciente afecta de MG con Ac antiMUSK. Presenta una debilidad facial significativa, tanto del orbicular de ojos como de labios, que confiere una fascies característica, así como una disfagia severa que requiere el uso de sonda naso-gástrica para la alimentación.

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

A pesar de el reducido número de pacientes con **Ac antiLRP4** descrito hasta el momento, estos anticuerpos parecen relacionarse con formas principalmente oculares o formas generalizadas leves, aunque en los casos doble positivos (LRP4-AChR o LRP4-MUSK) el fenotipo puede ser más grave^{88,113}.

Los pacientes **triple seronegativos** representan un grupo más heterogéneo, pero en general se asemejan más a aquellos con Ac antiAChR^{113,119}. Como ya se ha comentado, recientemente se ha descrito la presencia de **Ac antiAChR de baja afinidad** en pacientes previamente catalogados como seronegativos^{90,91}. Aunque el número de casos descritos hasta el momento es también escaso y no permite extraer conclusiones definitivas, un trabajo reciente mostraba que estos pacientes presentaban un debut de la enfermedad a edades más tempranas y tenían un fenotipo más leve, comparados con el resto de pacientes seronegativos⁹¹. En este estudio se detectaba la presencia de antiAChR de baja afinidad en un 38 % de pacientes previamente catalogados como seronegativos.

1.5.2. Situaciones de Riesgo Vital - Crisis Miasténicas

En las formas de MG generalizada la debilidad puede llegar a ser grave y en ocasiones comportar un riesgo vital para el paciente. Se entiende como Situación de Riesgo Vital (SRV) la presencia de sintomatología bulbar que comporta una insuficiencia respiratoria con necesidad de soporte ventilatorio mediante intubación orotraqueal (IOT) o ventilación mecánica no invasiva (VMNI) (Estadio MGFA V), o bien una disfagia severa que requiera el uso de sonda nasogástrica (SNG) para alimentación o por riesgo de aspiración (Estadio MGFA IVB)¹¹.

Se estima que entre el 10-20 % de pacientes afectados de MG presentarán una SRV en algún momento de la enfermedad^{112,120-123}. En los casos de MG asociada a timoma o aquellos con Ac antiMUSK se han descrito tasas mayores de crisis miasténicas, aunque existen divergencias en los estudios publicados^{82,114,115}. Con frecuencia estas SRV aparecen como debut de la enfermedad o durante los 2 primeros años de ésta, aunque pueden presentarse en cualquier momento en el curso de la enfermedad.

1 ■ INTRODUCCIÓN

En 2/3 de los casos es posible determinar algún desencadenante de la SRV. Los más comúnmente señalados son las infecciones, aunque existen otros posibles desencadenantes tales como el uso de algunos fármacos (principalmente antibióticos como los aminoglicósidos y quinolonas), la disminución del tratamiento inmunosupresor, el estrés emocional o físico, la cirugía, etc ^{111,112,121,123-125}. En las **Tabla 2 y 3** previas se recogen los desencadenantes descritos como más frecuentes.

La insuficiencia respiratoria que aparece en las SRV puede ser hipoxémica, hipercápnica o ambas, y deriva de una hipoventilación y una protección insuficiente de la vía aérea con incapacidad para eliminar correctamente las secreciones. Otra sintomatología que aparece en estas SRV es la disfagia, la regurgitación nasal, la disartria o voz nasalizada, y la debilidad mandibular y lingual ¹¹¹.

En los años sesenta la mortalidad de las crisis miasténicas era superior al 40%. El uso de las técnicas actuales en intensivos y los nuevos fármacos han permitido reducir hoy en día la mortalidad a un 5-10%. Actualmente la mortalidad se atribuye básicamente a comorbilidades o complicaciones derivadas de ingresos prolongados en intensivos, más que a la propia enfermedad ^{121,122,125,126}.

La duración de la SRV es variable en cada caso ^{121,124,126}. Las características propias de cada paciente, el tipo de desencadenante y el tratamiento recibido, son probablemente los factores que determinarán la evolución ante una SRV. Algunos autores han señalado la edad y las infecciones como factores de riesgo para un peor pronóstico ^{112,126}, aunque no todos los estudios respaldan esta afirmación. Además, Thomas reportó que un nivel de bicarbonato >30 mg/dl pre-intubación y/o una CVF <25 ml/kg en el 3^{er} día post-IOT eran factores independientes para una crisis prolongada, aunque estos hallazgos no han sido ratificados posteriormente ¹²⁶. En conjunto, no se conoce hasta el momento ningún biomarcador que permita predecir el riesgo de un paciente a presentar una SRV, ni tampoco predecir la evolución de ésta ni la respuesta a las diferentes terapias. En las SRV, disponer

de marcadores pronósticos o de respuesta al tratamiento sería de gran utilidad para planificar una estrategia terapéutica individualizada en cada paciente, prever la evolución y minimizar los efectos adversos. El *artículo nº2* de esta tesis fue diseñado con el objetivo de conocer las características de las SRV en nuestra población y estudiar los posibles marcadores pronósticos.

1.6. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS ACTUALES

Actualmente el **diagnóstico de MG** se establece en base a una sintomatología y exploración clínica compatibles, con la presencia o no de autoanticuerpos. Otros datos que pueden apoyar el diagnóstico son los test electrofisiológicos con la estimulación repetitiva y el estudio de fibra aislada, así como la respuesta a fármacos anticolinesterásicos o inmunosupresores.

Los **biomarcadores** se definen según la FDA de USA como datos que pueden medirse de forma objetiva y pueden indicar un proceso biológico normal, un proceso patogénico o una respuesta a una intervención terapéutica. Pueden ser proteínas, RNA, o pruebas complementarias de imagen, estudios electrofisiológicos, etc. En función de su utilidad, los biomarcadores pueden clasificarse en diferentes categorías: diagnósticos, de severidad clínica, de pronóstico clínico, de farmacodinamia, y de respuesta a fármacos¹²⁷.

Los biomarcadores actuales de los que disponemos para el diagnóstico de la Miastenia Gravis son los diferentes autoanticuerpos y los estudios electrofisiológicos. Sin embargo, los únicos biomarcadores de severidad clínica o pronósticos que existen hasta el momento son los Ac antiMUSK en un subgrupo reducido de pacientes. Esto resalta la necesidad de definir nuevos biomarcadores aplicables a todo el conjunto de pacientes para asegurar un manejo óptimo de la enfermedad.

1.6.1. Técnicas neurofisiológicas

El estudio electrofisiológico permite estudiar la patología de placa motora y orientar hacia una alteración post-sináptica. Se basa en dos técnicas: la estimulación repetitiva y el estudio de fibra aislada.

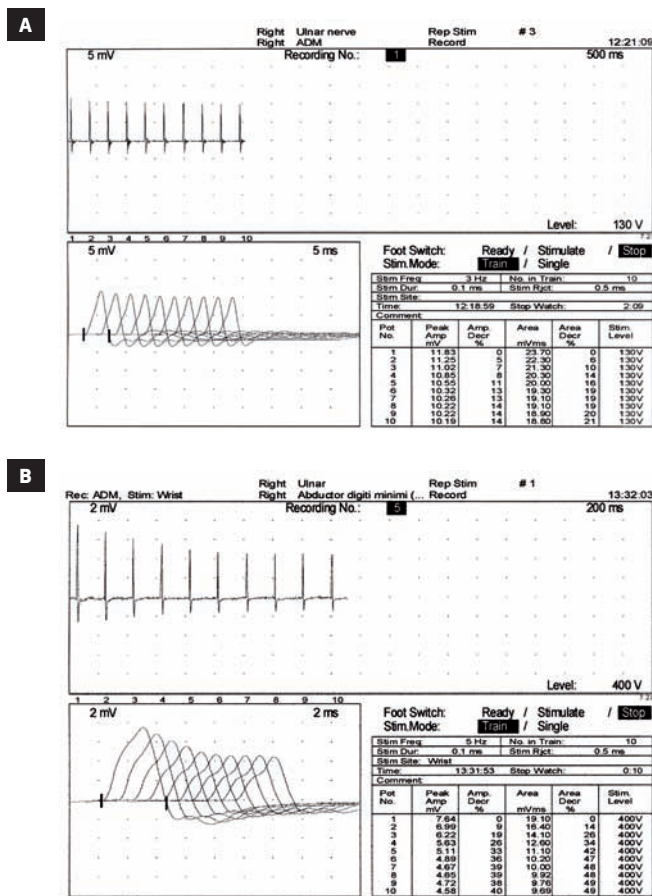


Figura 10: Ejemplo de estimulación repetitiva a bajas frecuencias sobre el *Abductor Digiti Minimi* (ADM):

A. En sujeto sano **B.** En paciente afecto de MG

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

La **estimulación repetitiva (ER)** es la prueba más frecuentemente usada para el estudio de enfermedades de la unión neuromuscular. Consiste en aplicar un tren de estímulos supra-máximos sobre un nervio motor y recoger los potenciales de acción motora en el músculo correspondiente. La ER a bajas frecuencias (2-5 Hz) se emplea para valorar el decremento de amplitud o área comparándose con el primer potencial, y se considera positiva cuando existe

un decremento de más de un 10% en el 4º o 5º potencial (**Figura 10**). Este tipo de estimulación es el usado para estudiar la patología post-sináptica de la unión neuromuscular, y posee una sensibilidad de entre 60-75% para el diagnóstico de MG generalizada cuando se examina musculatura proximal. En los casos de MG ocular, sin embargo, la sensibilidad diagnóstica es menor del 50%^{128,129}. La ER a altas frecuencias (20-50 Hz) se emplea en cambio para valorar trastornos pre-sinápticos, y se considera patológico cuando existe una facilitación de cómo mínimo un 100% respecto el potencial basal.

El estudio de **fibra aislada (SFEMG)** consiste en 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 interpotencial se conoce como "*jitter*" y se debe a un retraso sináptico en la formación de potenciales de acción entre fibras que dependen de la misma unidad motora. En la MG puede detectarse un aumento del *jitter* o incluso bloqueos, lo que traduce una inestabilidad de la sinapsis neuromuscular. Deben registrarse un mínimo de 20 pares, y se considera patológico un *jitter* medio alargado, un *jitter* individual aumentado en más del 10% de pares analizados o la presencia de bloqueos. Esta prueba se puede realizar mediante la activación voluntaria leve del músculo, o bien mediante la estimulación eléctrica con aguja monopolar. Esta técnica posee una sensibilidad del 82-99% para el diagnóstico de MG, principalmente cuando se examina más de un músculo^{128,129}. Sin embargo, no es una prueba específica ya que puede verse también alterada en otros procesos como miopatías inflamatorias, distrofias, polineuropatías o enfermedad de la neurona motora .

1.6.2. Test de edrofonio y test del hielo

El cloruro de edrofonio es un fármaco inhibidor de la acetilcolinesterasa, capaz de aumentar los niveles de acetilcolina en la placa motora de forma transitoria y provocar así un alivio sintomático. Mediante su administración endovenosa puede observarse de forma inmediata si se produce una mejoría de la ptosis, de la diplopía o de la debilidad de extremidades (**Figura 11**). Diferentes estudios demuestran sensibilidad diagnóstica 71.5-95% en

1 ■ INTRODUCCIÓN

MG generalizada ^{129,130}. Durante el procedimiento se debe monitorizar al paciente puesto que puede provocar efectos colinérgicos graves como bradicardias extremas o síncope.

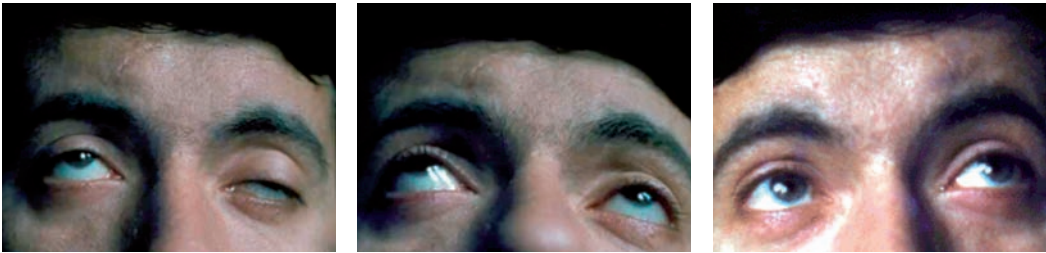


Figura 11: Test de edrofonio. Obsérvese la práctica resolución de la ptosis y la oftalmoparesia tras su administración.

El test del hielo es útil únicamente cuando existe una ptosis. Consiste en aplicar hielo local durante 2-5 minutos y observar si ésta mejora. Esta mejoría clínica es la traducción del efecto que el hielo tiene sobre los canales. Este test suele usarse en casos en que el cloruro de edrofonio está contraindicado ^{131,132}.

1.6.3. Autoanticuerpos

La presencia de anticuerpos antiAChR, antiMUSK o antiLRP4 en un paciente con una clínica compatible confirma el diagnóstico de MG. Sin embargo, como se ha comentado previamente, un 2-5% de pacientes son triple seronegativos.

Los Ac antiAChR se detectan en suero mediante radioinmunoensayo, que mide la cantidad de Ac que se une al receptor de ACh muscular marcado con α -bungarotoxina-I125 y precipita ¹⁵. Este test posee aproximadamente un 85% de sensibilidad para el diagnóstico de Miastenia Gravis generalizada y un 50% para la Miastenia Ocular ^{15,133}. Mediante ELISA es posible determinar también anticuerpos monoclonales bloqueantes del AChR o de anticuerpos moduladores del AChR, aunque estas técnicas añaden poca sensibilidad al diagnóstico ⁷¹. La determinación de estos anticuerpos antiAChR es una prueba fundamental para el diagnóstico de la enfermedad, sin embargo hasta el momento existen controversias sobre su utilidad para la monitorización clínica.

Los Ac antiMUSK se miden también mediante radioinmunoensayo, marcando con I125 el dominio extracelular de MUSK⁷⁴. Además su utilidad diagnóstica, son biomarcadores útiles para monitorizar la evolución y respuesta al tratamiento, ya que se correlacionan con el estado clínico del paciente^{75,81}. La presencia de estos antiMUSK también indica una peor respuesta al tratamiento anticolinesterásico y una buena respuesta al tratamiento con un anticuerpo monoclonal antiCD20, el Rituximab, al tratarse de anticuerpos de clase IgG 4^{83,134}. En el resto de pacientes, sin embargo, no disponemos de ningún biomarcador que permita predecir la respuesta a los diferentes fármacos o monitorizar la evolución clínica de estos pacientes. Y en los pacientes seronegativos no se dispone hasta el momento de ningún marcador analítico que permita confirmar el diagnóstico.

1.6.4. Nuevos biomarcadores: miRNAs

Recientemente los microRNAs (miRNAs) se han propuesto como posibles biomarcadores en múltiples enfermedades, incluida la MG. Los miRNAs son pequeñas moléculas de 18-25 nucleótidos, no codificantes, que desarrollan un papel fundamental en la regulación celular. Estas moléculas actúan regulando la expresión del RNA mensajero a nivel post-transcripcional, y son altamente específicos y estables en suero y plasma.

En los humanos se conocen más de 2000 miRNAs que están implicados en la regulación de un gran número de genes, de forma que un único miRNA puede regular cientos o miles de genes diana^{135,136}. La mayoría de miRNAs se sintetizan mediante la polimerasa II, que transcribe generando unas largas cadenas de RNA (pri-miRNA) que posteriormente son cortadas por la enzima nuclear “drosha”, formando los pre-miRNA. Estas moléculas se transportan del núcleo al citoplasma mediante la exportina 5. Una vez los pre-miRNAs están en el citoplasma, se fragmentan por la enzima “dicer”, obteniendo dos moléculas complementarias cortas de 18-25 nucleótidos. Una de estas moléculas es degradada, mientras que la otra se integra en el complejo RISC (RNA-induced silencing complex). Finalmente, este miRNA se une a la región 3' no traducida del RNA mensajero diana, promoviendo su degradación o inhibiendo su traducción^{135,137-139} (**Figura 12**). La expresión de los miRNAs se encuentra

1 ■ INTRODUCCIÓN

modulada por hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, y de forma recíproca por la expresión de los mismos genes diana^{140,141}.

Mediante este mecanismo de regulación genética post-transcripcional, los miRNAs modulan un gran número de procesos fisiológicos incluyendo la diferenciación y proliferación celular, migración, apoptosis y metabolismo¹⁴¹⁻¹⁴³. En el sistema inmune en concreto participan en procesos de diferenciación celular, maduración y activación de células T, respuesta de centros germinales, generación de células plasmáticas con Ig específicas, y respuesta a estímulos “toll-like receptor”^{135,140,144}.

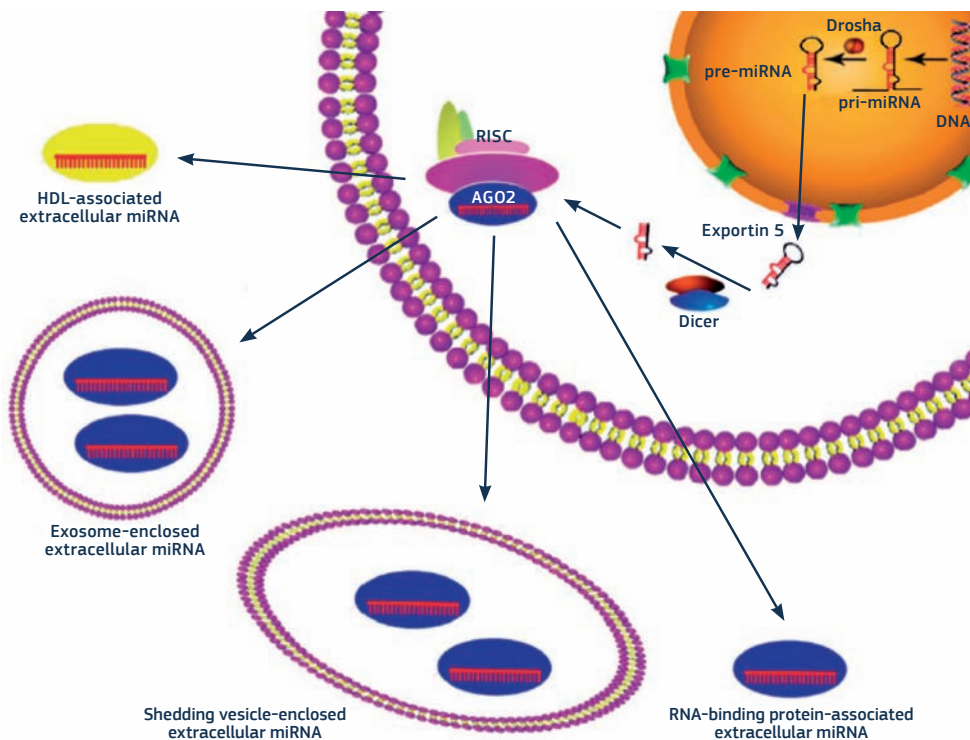


Figura 12: Esquema de síntesis de los miRNAs y formas de presentación a nivel extracelular.

Liang H et al, Wiley Interdiscip Rev RNA 2014¹³⁹.

Dado su papel regulador en múltiples procesos, una alteración en la expresión de determinados miRNAs puede contribuir a la patogenia de diferentes enfermedades tales como cáncer, diabetes, hepatopatías, enfermedades cardiovasculares, o distrofias musculares¹⁴⁵⁻¹⁴⁸.

Por ello, en los últimos años se ha sugerido que la cuantificación de estos miRNAs a nivel intracelular puede definir la presencia de una enfermedad. Además, existe una fracción de miRNAs que se encuentra circulando a nivel extracelular en forma de vesículas (ya sea microvesículas, exosomas, o cuerpos apoptóticos), o bien mediante su unión a complejos ribonucleoproteicos o lipoproteínas, lo que les confiere una gran estabilidad^{139,149,150} (**Figura 12**). Estos miRNAs circulantes provienen de órganos con daño tisular, células sanguíneas o tumores, entre otros, y tienen como función la comunicación intercelular o entre órganos. Los miRNAs circulantes pueden cuantificarse en diferentes fluidos, incluyendo suero, plasma, orina, leche materna y saliva¹³⁹. Al tratarse de moléculas altamente estables en muestras frescas o criopreservadas y ser de fácil obtención, estos miRNA circulantes pueden ser de gran utilidad como biomarcadores^{150,151}.

El perfil de miRNAs en pacientes con MG ha sido estudiado previamente en células mononucleares de sangre periférica. En el año 2012 se describió que la expresión del miRNA let-7c en células mononucleares está reducida en pacientes con MG comparados con controles sanos, y que este miRNA tienen un papel regulador sobre la IL-10, pudiendo contribuir a la inducción o progresión de la enfermedad¹⁵². El mismo grupo describió un año más tarde que el miR320a se encuentra también infraexpresado en estos pacientes, y que esto contribuye a la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2, INF γ y IL-17¹⁵³. Otro estudio demostró que el miR145 también está infraexpresado en pacientes con MG y en formas experimentales de MG (EAMG), y que este miRNA tiene como dianas el receptor CD28 y el factor de transcripción NFATc1, sugiriendo un papel regulador en la proliferación de células T y la diferenciación de Th17¹⁵⁴. Un último estudio mostró una sobreexpresión del miR146a en células mononucleares de pacientes con MG vs controles, y que éste tiene una función reguladora de genes como CD40, CD80, TLR4 y NF κ B en células B que expresan AChR¹⁵⁵.

A pesar de los diferentes trabajos enfocados a describir los miRNAs en células mononucleares de pacientes con MG, el perfil de miRNAs circulantes en sangre periférica no había sido descrito hasta el momento. En el **artículo nº 1** de la tesis aportamos los resultados del análisis de miRNAs circulantes en pacientes con Miastenia Gravis autoinmune.

1.7. TRATAMIENTO

El tratamiento de la MG se basa en la terapia inmunosupresora de base, ya sea con corticoides solos o asociados a otros inmunosupresores, junto al tratamiento sintomático con anticolinesterásicos ^{156,157} (Figura 13). En las exacerbaciones y en las SRV pueden además usarse tratamientos inmunomoduladores con IgEV o plasmaféresis.

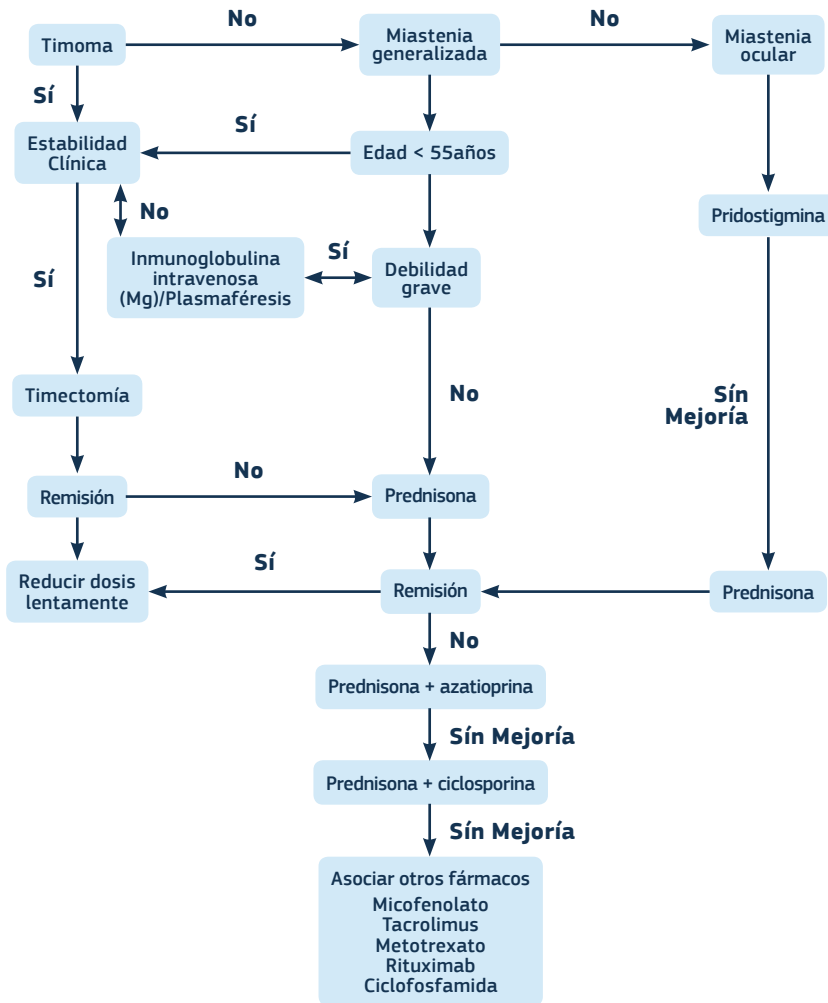


Figura 13: Esquema terapéutico en pacientes con Miastenia Gravis. Adaptado de Díaz-Manera et al, Expert Opin Pharmacother 2012 ¹⁵⁷.

1.7.1. Tratamiento sintomático

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa inhiben la degradación de la ACh en la unión neuromuscular, aumentando la posibilidad de unión de la ACh con su receptor y, por tanto, facilitando la activación muscular. El fármaco más usado de este grupo es la piridostigmina, que suele ser bien tolerada y que induce una mejoría clínica en la mayoría de pacientes miasténicos (**Figura 14**)^{10,156}. En algunas formas oculares o leves de la enfermedad puede ser suficiente su uso de forma aislada. Sin embargo, los anticolinesterásicos pueden no ser efectivos en los pacientes con MG-MUSK, e incluso comportar un exceso de efectos secundarios en este grupo de pacientes¹⁵⁸.



Figura 14: Efectos de la piridostigmina en paciente con MG generalizada y Ac antiAChR:
A. Situación basal **B.** A los 30 minutos de administrar un comprimido de Mestinon (piridostigmina)
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

1.7.2. Tratamiento inmunosupresor

El tratamiento definitivo de la MG está dirigido a inhibir la respuesta autoinmune.

Los **corticoides** orales son los fármacos recomendados como primera opción según las principales guías terapéuticas. Aunque no existen estudios controlados que demuestren su eficacia, la evidencia que ofrecen los estudios observacionales es suficiente para considerarlos el tratamiento de elección en aquellos pacientes que necesitan tratamiento inmunosupresor¹⁵⁹⁻¹⁶³. Se considera que inducen una mejoría significativa en el 70-80% de los pacientes, aunque no se han realizado estudios controlados doble ciego. Al administrarse a

1 ■ INTRODUCCIÓN

dosis altas pueden provocar un empeoramiento clínico transitorio los primeros días, y se ha descrito que incluso pueden llegar a comportar una situación de riesgo vital. Los corticoides pueden ocasionar diversos efectos secundarios. Los más frecuentes a corto plazo son el aumento de peso, retención de líquidos, hipertensión, hiperglicemia, alteraciones psiquiátricas (síntomas psicóticos, ansiedad, depresión, insomnio), glaucoma. A largo plazo pueden provocar cataratas, osteoporosis, necrosis avascular de la cabeza del fémur, miopatía y úlceras gastrointestinales, entre otros.

Cuando la respuesta es insuficiente o la dosis de corticoides necesaria para mantener la mejoría clínica es elevada (>20mg/48h de Prednisona según las guías Británicas), debe asociarse al tratamiento con corticoides otros fármacos inmunosupresores^{156,164}. Existen diferentes opciones terapéuticas:

- ▶ La **Azatioprina** se metaboliza a 6-mercaptopurina y esta actúa inhibiendo la síntesis de las purinas, interrumpiendo la síntesis de DNA y RNA e interfiriendo con la actividad de las células T. Múltiples series de casos respaldan su utilidad sola o en combinación con corticoides para el tratamiento de pacientes con MG^{165,166}, y en 1998 se publicó un ensayo doble ciego randomizado sobre el beneficio de la AZA + PDN⁷³. El efecto terapéutico suele iniciarse a los 6-12 meses. Antes de administrarse puede medirse la actividad de la tiopurina metil-transferasa (TMPT) para ajustar la dosis y evitar efectos adversos graves como pancitopenia o hepatotoxicidad, aunque éstos suelen ser reversibles al reducir la dosis o retirar el tratamiento¹⁶⁷.
- ▶ La **Ciclosporina A** actúa por la vía de la calcineurina inhibiendo la función de las células T. Existen 2 ensayos randomizados que avalan su eficacia en pacientes con MG^{168,169} junto con múltiples estudios retrospectivos que también apoyan su utilidad¹⁷⁰. Este fármaco se usa como opción terapéutica cuando la AZA no es eficaz o en aquellos pacientes con una patología grave que no ha mejorado con prednisona, ya que su efecto terapéutico es más rápido que el de los demás inmunosupresores, entre 1-3 meses. Como efectos secundarios graves puede provocar nefrotoxicidad e hipertensión, y otros habitualmente menos importantes como hipertricosis o hiperplasia gingival. Su principal inconveniente es la interacción con otros fármacos y la necesidad de determinar los niveles plasmáticos.

- ▶ El **Micofenolato Mofetil** es un inhibidor de la síntesis de las purinas que altera de forma relativamente selectiva la proliferación linfocítica. Su eficacia en MG ha sido descrita en series de casos ^{171,172}, aunque dos estudios randomizados publicados en el 2008 no pudieron demostrar su superioridad vs placebo ^{173,174}. Puede usarse como ahorrador de corticoides en aquellos pacientes que no toleran la AZA o en los que su efecto ha sido insuficiente. Su acción sobre el curso clínico del paciente se sitúa entre 3-9 meses. Los efectos secundarios más frecuentes suelen ser leves en forma de molestias gastrointestinales, cefalea o reacciones cutáneas. Al ser teratogénico está contraindicado en el embarazo y lactancia.
- ▶ El **Tacrolimus (FK506)**, al igual que la Ciclosporina, inhibe la proliferación de las células T por la vía de la calcineurina. Representa una alternativa para pacientes con MG que no ha respondido a los IS previos, y su eficacia se ha demostrado en series de casos ¹⁷⁵ y en un estudio abierto ¹⁷⁶. Se utiliza mayoritariamente en Japón. Posee también un perfil de efectos secundarios similar a la CsA, y puede además provocar alteraciones del sistema nervioso como cefalea, temblor, insomnio y parestesias.
- ▶ El **Metotrexato** provoca una depleción del folato celular con cese de la síntesis de bases purínicas y pirimidínicas, interrumpiendo así la proliferación celular. Su recomendación de uso en pacientes con MG se basa únicamente en opiniones de expertos, mayoritariamente del reino unido, reservándose como alternativa cuando no existe respuesta al resto de fármacos ^{156,177}. El efecto terapéutico puede presentarse entre 3-10 meses después de iniciarlo. Los efectos adversos más frecuentes son las alteraciones gastrointestinales, la mielosupresión o la pneumonitis. Es además un fármaco teratogénico, y su uso a largo plazo se ha asociado a un mayor riesgo de neoplasias hematológicas.
- ▶ La **Ciclofosfamida** es un agente alquilante que actúa generando puentes intra/intercatenarios, promoviendo así el entrecruzamiento de cadenas de DNA y RNA y bloqueando la replicación de los linfocitos B y T. Es un fármaco de “tercera línea”, reservado para aquellos pacientes refractarios al resto de tratamientos. Su eficacia en MG se respalda en ensayos aleatorizados en pacientes refractarios a otros tratamientos ^{178,179}. Puede provocar efectos secundarios graves como mielosupresión, cistitis hemorrágica o neoplasias uroteliales.

- ▶ El **Rituximab** es un anticuerpo monoclonal antiCD20 que actúa selectivamente contra los linfocitos B circulantes por tres mecanismos: la citotoxicidad mediada por anticuerpos, por complemento y la estimulación de la apoptosis. El Rituximab ha demostrado ser un fármaco especialmente útil en enfermedades mediadas por IgG4, como la MG antiMUSK. En estos pacientes provoca una franca mejoría clínica que es además mantenida en el tiempo, y que se relaciona con una reducción del título de anticuerpos^{83,134,180}. En los casos de MG antiAChR también ha demostrado ser útil, aunque la respuesta no es tan marcada ni perdurable, y en muchos casos es necesario re-infundir al paciente^{134,180}. Los efectos adversos más habituales son las reacciones pseudogripales, la trombocitopenia, anemia, neutropenia, y la depleción de células B. Además pueden existir reacciones relacionadas con la infusión parenteral que desaparecen al descender la velocidad de infusión o parar el tratamiento: urticaria, exantema, cefalea, broncoespasmo, angioedema, rinitis, hipotensión, y alteraciones del ritmo cardíaco.

1.7.3. Tratamiento inmunomodulador

Las inmunoglobulinas endovenosas (IgEV) y la plasmaféresis (PLEX) son terapias usadas en situaciones que requieren una mejoría clínica rápida, por ejemplo en exacerbaciones, en situaciones de riesgo vital o bien como preparación a la cirugía si el paciente está en una situación clínica de gravedad¹⁸¹. Pueden usarse también en pacientes que presentan alguna contraindicación o intolerancia a los inmunosupresores.

Las **IgEV** actúan a diversos niveles de la respuesta inmune: se unen al complemento y a algunos anticuerpos para neutralizarlos, modulan el efecto de citoquinas proinflamatorias, inhiben vías de señalización intracelular y bloquean el desplazamiento celular mediante la inhibición de moléculas de adhesión^{182,183}. Sin embargo, el mecanismo final por el que las IgEV producen una mejoría clínica en pacientes con MG no es del todo conocido. Las principales complicaciones de este tratamiento derivan de infundir volúmenes grandes de preparaciones viscosas, que pueden provocar alteraciones hemodinámicas y situaciones pro-trombóticas.

Mediante la **PLEX** se realiza una eliminación de partículas grandes del plasma incluyendo los autoanticuerpos, lo que se traduce en una mejoría sintomática en la mayoría de pacientes. Como efectos secundarios puede provocar hipotensión, hipocalcemia y sangrados por reducción de los factores de coagulación.

Actualmente se considera que las IgEV y la PLEX son igualmente eficaces para tratar las exacerbaciones en MG de carácter moderado o severo, con un perfil de tolerancia y de duración del efecto también parecido^{10,184,185}. Por este motivo ambos tratamientos pueden plantearse como opción terapéutica, dependiendo de su accesibilidad en cada centro.

1.7.4. Timectomía

Aunque la timectomía es una técnica ampliamente usada para el tratamiento de la MG, no existen a día de hoy estudios randomizados que avalen su eficacia. Se acepta que en todos los casos de MG asociada a timoma debe realizarse una timectomía, independientemente de la técnica usada (transesternal, transcervical, toracoscópica)¹¹. En pacientes jóvenes con MG generalizada sin timoma, la exéresis tímica puede considerarse un opción para aumentar las posibilidades de mejoría. Dos revisiones (2000 y 2014) concluían que los pacientes timectomizados sin timoma tenían una mayor posibilidad de alcanzar la remisión farmacológica o de mejorar clínicamente comparados con los no-timectomizados, especialmente en los casos de MG generalizada grave en pacientes <45 años. Sin embargo, puesto que estos datos se basaban en estudios controlados pero no randomizados y con múltiples factores confusores y con divergencias entre los grupos estudiados (timectomizados vs no-timectomizados), no se puede establecer de forma definitiva que exista un beneficio de la timectomía en pacientes sin timoma^{21,186}.

Actualmente se está llevando a cabo un estudio multicéntrico randomizado comparando la timectomía vs no timectomía en pacientes tratados con prednisona, cuyos resultados se espera que se hagan públicos en el 2016 y ayuden a esclarecer su utilidad.

1.7.5. Manejo de las Situaciones de Riesgo Vital

En las SRV puede aparecer una insuficiencia respiratoria que requiera de intubación orotraqueal (IOT) o de ventilación mecánica no invasiva (VMNI), o bien una disfagia severa que requiera la colocación de una sonda nasogástrica (SNG). La decisión de intubar al paciente ante una SRV debe ser individualizada. Se dispone de una serie de parámetros orientativos, aunque finalmente la clínica será el principal determinante. Las medidas objetivas tales como la Capacidad Vital Forzada (CVF), el peak-flow, el pulso o la TA son más relevantes que la gasometría^{110,111}. En general se considera necesario intubar si la CVF <20 ml/Kg, aunque en ocasiones esta medida es difícil de obtener por la propia situación del paciente o por la debilidad facial que acompaña al cortejo sintomático¹⁸⁷. Cuando aparece una SRV, el paciente debe mantenerse ingresado en una unidad de críticos para su monitorización estricta y su manejo adecuado. La terapia inmunomoduladora con IgEV o PLEX debe iniciarse cuanto antes, y si el paciente ya se encontraba bajo tratamiento inmunosupresor se recomienda aumentar la dosis de éste, o bien iniciarlo si no lo estaba tomando. En los casos en que se requiere soporte ventilatorio, los anticolinesterásicos pueden representar un problema puesto que aumentan las secreciones. La rápida detección de estas SRV y sus desencadenantes, y un manejo inmediato en una unidad de críticos, son cruciales para una buena evolución.

1.8. REGISTRO NMD-ES

El registro español de enfermedades neuromusculares (NMD-ES) fue creado en el año 2010 con la misión de registrar el mayor número de pacientes con enfermedades neuromusculares en nuestro país. Durante sus cinco años de existencia ha pasado por diferentes fases de financiación: proyecto CIBERNED (Centro de Investigación en red de enfermedades neurodegenerativas), proyecto FIS (fondo de investigación sanitaria, Instituto de salud Carlos III) y actualmente recibe financiación de CIBERER (Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras). Ha contado desde su inicio con el apoyo del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, que garantiza además los aspectos legales.

El objetivo del registro es recoger las características clínicas, demográficas y el resultado de los test diagnósticos de los pacientes, para poder investigar nuevos genes, biomarcadores y

patrones de neuroimagen, así como la elaboración de algoritmos diagnósticos. NMD-ES también puede ser una herramienta útil para la búsqueda de candidatos para ensayos clínicos.

Se trata de un registro longitudinal realizado por neurólogos expertos de 28 hospitales de todo el país, que contiene información retrospectiva y prospectiva. En el proyecto NMD-ES existen actualmente 10 registros operativos que engloban las siguientes enfermedades neuromusculares: Miastenia Gravis, neuropatías hereditarias, neuropatías inflamatorias, ELA, distrofias musculares, enfermedad de Pompe, miopatía del enfermo crítico, miopatías mitocondriales, miositis por cuerpos de inclusión y miastenia congénita.

Cada registro tiene asignado un grupo de expertos encargados de su diseño y desarrollo, y se realizan encuentros periódicos entre los diferentes grupos para actualizar los contenidos y estudiar la viabilidad de nuevos registros. La información contenida en los registros es anónima, cumple los requisitos legales en cuanto a confidencialidad y protección de datos, y es accesible a todos los participantes. Todos los pacientes incluidos deben firmar un consentimiento informado. El registro dispone de un protocolo donde se define la metodología utilizada para asegurar la calidad de los datos: sistema de monitorización e indicadores de calidad. Existen también manuales informativos sobre el funcionamiento de los registros para todos los participantes.

En el momento de la redacción de este documento hay registrados 4647 pacientes en total, y en el registro de Miastenia Gravis en concreto existen datos de 1118 pacientes. El registro de MG consta de 146 campos de información. Se recogen datos demográficos, clínicos, pruebas diagnósticas (EMG, analítica), escalas funcionales y tratamiento. El registro permite incluir visitas de seguimiento, donde se recogen datos de evolución clínica del paciente de forma prospectiva.

En el **artículo nº2** de esta tesis aportamos el resultado del análisis de los pacientes incluidos en el registro NMD-ES con Miastenia Gravis que presentaron una SRV en algún momento de la enfermedad.

1.9. BIBLIOGRAFÍA

1. Drachman DB. Myasthenia Gravis. *N Engl J Med.* 1994;330(25):1797–810.
2. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol.* 2009;8(5):475–90.
3. Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune Response to Acetylcholine Receptor. *Science.* 1973;180(4088):871–2.
4. 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.
5. Phillips LH. The epidemiology of myasthenia gravis. *Seminars in Neurology.* 2004;24(1):17–20.
6. 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.
7. Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO, McConville J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol.* 2010;10:46.
8. Aragonès JM, Bolívar I, Bonfill X, Bufill E, Mummany A, Alonso F, et al. Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology.* 2003;60(6):1024–6.
9. Aragonès JM, 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.
10. Keeseey JC. Clinical evaluation and management of myasthenia gravis. *Muscle and Nerve.* 2004;29(4):484–505.
11. Jaretzki a., Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keeseey JC, Penn a. S, et al. Myasthenia gravis: Recommendations for clinical research standards. *Neurology.* 2000;55(1):16–23.
12. Živković S a., Clemens PR, Lacomis D. Characteristics of late-onset myasthenia gravis. *J Neurol.* 2012;259(10):2167–71.
13. Alkhawajah NM, Oger J. Late-onset myasthenia gravis: A review when incidence in older adults keeps increasing. *Muscle and Nerve.* 2013;48(5):705–10.
14. Aarli J a. Myasthenia gravis in the elderly: Is it different? *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:238–43.
15. Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology.* 1976;26(11):1054–9.
16. 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.
17. 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.
18. Fujii Y. Thymus, thymoma and myasthenia gravis. *Surg Today.* 2013;43(5):461–6.
19. Lauriola L, Ranelletti F, Maggiano N, Guerriero M, Punzi C, Marsili F, et al. Thymus changes in anti-MuSK-positive and -negative myasthenia gravis. *Neurology.* 2005;64(3):536–8.
20. Jaretzki A, Steinglass KM, Sonett JR. Thymectomy in the management of myasthenia gravis. *Semin Neurol.* 2004;24(1):49–62.

21. Diaz A, Black E, Dunning J. Is thymectomy in non-thymomatous myasthenia gravis of any benefit? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2014;18(3):381–9.
22. Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*. 2014;52:90–100.
23. Cavalcante P, Cufi P, Mantegazza R, Berrih-Aknin S, Bernasconi P, Le Panse R. Etiology of myasthenia gravis: Innate immunity signature in pathological thymus. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):863–74.
24. Janer M, Cowland A, Picard J, Campbell D, Pontarotti P, Newsom-Davis J, et al. A susceptibility region for myasthenia gravis extending into the HLA- class I sector telomeric to HLA-C. *Hum Immunol*. 1999;60(9):909–17.
25. Giraud M, Beaurain G, Eymard B, Tranchant C, Gajdos P, Garchon H-J. Genetic control of autoantibody expression in autoimmune myasthenia gravis: role of the self-antigen and of HLA-linked loci. *Genes Immun*. 2004;5(5):398–404.
26. Giraud M, Vandiedonck C, Garchon H-J. Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132:180–92.
27. Maniaol AH, Elsais A, Lorentzen ÅR, Owe JF, Viken MK, Sæther H, et al. Late onset myasthenia gravis is associated with HLA DRB1*15:01 in the norwegian population. *PLoS One*. 2012;7(5):e36603.
28. Chen WH, Chiu HC, Hseih RP. Association of HLA-Bw46DR9 combination with juvenile myasthenia gravis in Chinese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(4):382–5.
29. Niks EH, Kuks JBM, Roep BO, Haasnoot GW, Verduijn W, Ballieux BEPB, et al. Strong association of MuSK antibody-positive myasthenia gravis and HLA-DR14-DQ5. *Neurology*. 2006;66(11):1772–4.
30. Zagoriti Z, Kambouris ME, Patrinos GP, Tzartos SJ, Poulas K. Recent advances in genetic predisposition of myasthenia gravis. *Biomed Res Int*. 2013;2013:404053.
31. Avidan N, Le Panse R, Berrih-Aknin S, Miller A. Genetic basis of myasthenia gravis - A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2014;52:146–53.
32. Gregersen PK, Kosoy R, Lee AT, Lamb J, Sussman J, McKee D, et al. Risk for myasthenia gravis maps to a 151Pro→Ala change in TNIP1 and to human leukocyte antigen-B*08. *Ann Neurol*. 2012;72(6):927–35.
33. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocrine Reviews*. 2007;28(5):521–74.
34. 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;5:42.
35. Nancy P, Berrih-Aknin S. Differential estrogen receptor expression in autoimmune myasthenia gravis. *Endocrinology*. 2005;146(5):2345–53.
36. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol*. 2008;68(3):261–9.
37. Querol L, Illa I. Myasthenia gravis and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol*. 2013;26(5):459–65.
38. Askmark H, Haggård L, Nygren I, Punga a R. Vitamin D deficiency in patients with myasthenia gravis and improvement of fatigue after supplementation of vitamin D3: a pilot study. *Eur J Neurol*. 2012;19(12):1554–60.
39. 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.

1 ■ INTRODUCCIÓN

40. Leis AA, Szatmary G, Ross MA, Stokic DS. West Nile virus infection and myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2014;49(1):26-9.
41. Berrih-Aknin S. Myasthenia Gravis: Paradox versus paradigm in autoimmunity. *J Autoimmun*. 2014;52:1-28.
42. Hughes BW, De Casillas MLM, Kaminski HJ. Pathophysiology of myasthenia gravis. *Semin Neurol*. 2004;24(1):21-30.
43. Gradolatto A, Nazzari 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.
44. Zhang J, Chen Y, Jia G, Chen X, Lu J, Yang H, et al. FOXP3 -3279 and IVS9+459 polymorphisms are associated with genetic susceptibility to myasthenia gravis. *Neurosci Lett*. 2013;534(1):274-8.
45. Balandina A, Lécart S, Dartevielle P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood*. 2005;105(2):735-41.
46. Thirupathi 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.
47. Gertel-Lapter S, Mizrahi 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.
48. Hurst J, von Landenberg P. Toll-like receptors and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2008;7(3):204-8.
49. 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.
50. 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.
51. Cufi P, Dragin N, Weiss JM, Martinez-Martinez P, De Baets MH, Roussin R, et al. Implication of double-stranded RNA signaling in the etiology of autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 2013;73(2):281-93.
52. Tindall RS. Humoral immunity in myasthenia gravis: biochemical characterization of acquired antireceptor antibodies and clinical correlations. *Ann Neurol*. 1981;10(5):437-47.
53. Demaine A, Willcox N, Janer M, Welsh K, Newsom-Davis J. Immunoglobulin heavy chain gene associations in myasthenia gravis: new evidence for disease heterogeneity. *J Neurol*. 1992;239(1):53-6.
54. Lefvert AK, Cuénoud S, Fulpius BW. Binding properties and subclass distribution of anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 1981;1(1):125-35.
55. 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.
56. Verschuuren JJGM, Huijbers MG, Plomp JJ, Niks EH, Molenaar PC, Martinez-Martinez P, et al. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):918-23.
57. Lefvert A K, Bergstrom K, Matell G. Determination of acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis : clinical usefulness and pathogenetic implications. *Receptor*. 1978;394-403.
58. Lindstrom JM. Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle and Nerve*. 2000;23(4):453-77.
59. Engel AG, Lambert EH, Howard FM. Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clin Proc*. 1977;52(5):267-80.

60. Tüzün E, Christadoss P. Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev.* 2013;12(9):904–11.
61. Basta M, Illa I, Dalakas MC. Increased in vitro uptake of the complement C3b in the serum of patients with Guillain-Barré syndrome, myasthenia gravis and dermatomyositis. *J Neuroimmunol.* 1996;71(1-2):227–9.
62. 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.
63. Heinemann S, Bevan S, Kullberg R, Lindstrom J, Rice J. Modulation of acetylcholine receptor by antibody against the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(7):3090–4.
64. Almon RR, Andrew CG, Appel SH. Serum globulin in myasthenia gravis: inhibition of alpha-bungarotoxin binding to acetylcholine receptors. *Science.* 1974;186(4158):55–7.
65. Conti-fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Science in medicine Myasthenia gravis : past , present , and future. 2006;116(11):2843–54.
66. Tzartos SJ, Lindstrom JM. Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(2):755–9.
67. Luo J, Lindstrom J. Antigenic structure of the human muscle nicotinic acetylcholine receptor main immunogenic region. *J Mol Neurosci.* 2010;40(1-2):217–20.
68. 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.* 2009;29(44):13898–908.
69. Oosterhuis HJ, Limburg PC, Hummel-Tappel E, The TH. Anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. Part 2. Clinical and serological follow-up of individual patients. *J Neurol Sci.* 1983;58(3):371–85.
70. Vincent A, Newsom Davis J. Anti-acetylcholine receptor antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1980;43(7):590–600.
71. Howard FM, Lennon VA, Finley J, Matsumoto J, Elveback LR. Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci.* 1987;505:526–38
72. Masuda T, Motomura M, Utsugisawa K, Nagane Y, Nakata R, Tokuda M, et al. Antibodies against the main immunogenic region of the acetylcholine receptor correlate with disease severity in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83(9):935–40.
73. Palace J, Newsom-Davis J, Lecky B. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Study Group. *Neurology.* 1998;50(6):1778–83.
74. 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
75. 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.
76. 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 USA.* 2013;110(51):20783–8.

1 ■ INTRODUCCIÓN

77. 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.
78. Burden SJ, Yumoto N, Zhang W. The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(5):a009167.
79. Zhang W, Coldefy A-S, Hubbard SR, Burden SJ. Agrin Binds to the N-terminal Region of Lrp4 Protein and Stimulates Association between Lrp4 and the First Immunoglobulin-like Domain in Muscle-specific Kinase (MuSK). *J Biol Chem*. 2011;286(47):40624-30.
80. Yumoto N, Kim N, Burden SJ. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature*. 2012;489(7416):438-42.
81. Bartocconi E, Scuderi F, Minicuci GM, Marino M, Ciaraffa F, Evoli A. Anti-MuSK antibodies: Correlation with myasthenia gravis severity. *Neurology*. 2006;67(3):505-7.
82. Wolfe GI, Oh SJ. Clinical phenotype of muscle-specific tyrosine kinase-antibody-positive myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132:71-5.
83. Illa I, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Pradas J, Rey A, Blesa R, et al. Sustained response to Rituximab in anti-AChR and anti-MuSK positive Myasthenia Gravis patients. *J Neuroimmunol*. 2008;201-202(C):90-4.
84. Illa I, Díaz-Manera JA, Juárez C, Rojas-García R, Molina-Porcel L, Aleu A, et al. "Seronegative" myasthenia gravis and antiMuSK positive antibodies: description of Spanish series. *Med Clin (Barc)*. 2005;125(3):100-2.
85. 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.
86. Tzartos JS. Autoantibodies to Lipoprotein-Related Protein 4 in Patients With Double-Seronegative Myasthenia Gravis. *Arch Neurol*. 2012;69(4):445.
87. Pevzner A, Schoser B, Peters K, Cosma N-C, Karakatsani A, Schalke B, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol*. 2012;259(3):427-35.
88. Zisimopoulou P, Evangelakou P, Tzartos J, Lazaridis K, Zouvelou V, Mantegazza R, et al. A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2013;52:139-45.
89. 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.
90. Jacob S, Viegas S, Leite MI, Wbster R, Cossins J, Kennett R, et al. Presence and Pathogenic Relevance of Antibodies to Clustered Acetylcholine Receptor in Ocular and Generalized Myasthenia Gravis Clustered ACh. *Arch Neurol*. 2012;69(8):994-1001.
91. 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. 2015;72(6):642-9.
92. Vrolix K, Fraussen J, Molenaar PC, Losen M, Somers V, Stinissen P, et al. The auto-antigen repertoire in myasthenia gravis. *Autoimmunity*. 2010;43(5-6):380-400.
93. Gallardo E, Martínez-Hernández E, Titulaer MJ, Huijbers MG, Martínez MA, Ramos A, et al. Cortactin auto-antibodies in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(10):1003-7.

94. Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguás E, Grau-Junyent JM, Vilar-dell-Tarrés M, et al. Identification of a novel myositis-associated antibody directed against cortactin. *Autoimmun Rev.* 2014;13(10):1008–12.
95. Zhang B, Shen C, Bealmeab B, Ragheb S, Xiong WC, Lewis R a., et al. Autoantibodies to agrin in myasthenia gravis patients. *PLoS One.* 2014;9(3):4–9.
96. 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.
97. 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.
98. Mygland A, Tysnes OB, Matre R, Volpe P, Aarli JA, Gilhus NE. Ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis patients with a thymoma. *Ann Neurol.* 1992;32(4):589–91.
99. Ohta M, Ohta K, Itoh N, Kurobe M, Hayashi K, Nishitani H. Anti-skeletal muscle antibodies in the sera from myasthenic patients with thymoma: identification of anti-myosin, actomyosin, actin, and alpha-actinin antibodies by a solid-phase radioimmunoassay and a western blotting analysis. *Clin Chim Acta.* 1990;187(3):255–64.
100. Voltz R, Albrich W, Hohlfeld R, Nagel D, Wick M, Kirchner T, et al. Anti-titin antibodies are not associated with a specific thymoma histology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(2):282–282.
101. Romi F, Skeie GO, Aarli J a., Gilhus NE. Muscle autoantibodies in subgroups of myasthenia gravis patients. *J Neurol.* 2000;247(5):369–75.
102. Cavalcante P, le Panse R, Berrih-Aknin S, Maggi L, Antozzi C, Baggi F, et al. The thymus in myasthenia gravis: Site of “innate autoimmunity”? *Muscle and Nerve.* 2011;44(4):467–84.
103. Levinson AI. Modeling the intrathymic pathogenesis of myasthenia gravis. *J Neurol Sci.* 2013;333(1-2):60–7.
104. Skeie GO, Romi F. Paraneoplastic myasthenia gravis: Immunological and clinical aspects. *European Journal of Neurology.* 2008;15(10):1029–33.
105. Willcox N, Schluep M, Ritter M a, Schuurman HJ, Newsom-Davis J, Christensson B. Myasthenic and nonmyasthenic thymoma. An expansion of a minor cortical epithelial cell subset? *Am J Pathol.* 1987;127(3):447–60.
106. Marx A, Ströbel P, Badve SS, Chalabreysse L, Chan JKC, Chen G, et al. ITMIG consensus statement on the use of the WHO histological classification of thymoma and thymic carcinoma: refined definitions, histological criteria, and reporting. *J Thorac Oncol.* 2014;9(5):596–611.
107. 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.
108. Sommer N, Melms A, Weller M, Dichgans J. Ocular myasthenia gravis. A critical review of clinical and pathophysiological aspects. *Doc Ophthalmol.* 1993;84(4):309–33.
109. Grob D, Brunner N, Namba T, Pagala M. Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle and Nerve.* 2008;37(2):141–9.
110. Chaudhuri a., Behan PO. Myasthenic crisis. *Qjm.* 2009;102(2):97–107.
111. Godoy DA, Mello LJV De, Masotti L, Napoli M Di. The myasthenic patient in crisis: an update of the management in Neurointensive Care Unit. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013;71(9A):627–39.

1 ■ INTRODUCCIÓN

112. Kalita J, Kohat a. K, Misra UK. Predictors of outcome of myasthenic crisis. *Neurol Sci.* 2014;35(7):1109–14.
113. Gilhus NE, Verschuuren JJ. Myasthenia gravis : subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* 2015;14(10):1023–36.
114. Evoli A, Minisci C, Di Schino C, Marsili F, Punzi C, Batocchi AP, et al. Thymoma in patients with MG: characteristics and long-term outcome. *Neurology.* 2002;59(12):1844–50.
115. Romi F, Gilhus NE, Varhaug JE, Myking A, Aarli JA. Disease severity and outcome in thymoma myasthenia gravis: A long-term observation study. *Eur J Neurol.* 2003;10(6):701–6.
116. Luchanok U, Kaminski HJ. Ocular myasthenia: diagnostic and treatment recommendations and the evidence base. *Curr Opin Neurol.* 2008;21(1):8–15.
117. Soltys J, Gong B, Kaminski HJ, Zhou Y, Kusner LL. Extraocular muscle susceptibility to myasthenia gravis: Unique immunological environment?. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1132:220–4.
118. Leite MI, Scöbel P, Jones M, Micklem K, Moritz R, Gold R, et al. Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG. *Ann Neurol.* 2005;57(3):444–8.
119. Vincent A, McConville J, Farrugia ME, Newsom-Davis J. Seronegative myasthenia gravis. *Seminars in Neurology.* 2004;24(1):125–33.
120. Panda S, Goyal V, Behari M, Singh S, Srivastava T. Myasthenic crisis: a retrospective study. *Neurol India.* 2004;52(4):453–6.
121. Murthy JMK, Meena a K, Chowdary GVS, Naryanan JT. Myasthenic crisis: clinical features, complications and mortality. *Neurol India.* 2005;53(1):37–40; discussion 40.
122. Alshekhlee A, Miles JD, Katirji B, Preston DC, Kaminski HJ. Incidence and mortality rates of myasthenia gravis and myasthenic crisis in US hospitals. *Neurology.* 2009;72(18):1548–54.
123. Sakaguchi H, Yamashita S, Hirano T, Nakajima M, Kimura E, Maeda Y, et al. Myasthenic crisis patients who require intensive care unit management. *Muscle and Nerve.* 2012;46(3):440–2.
124. Sharma S, Lal V, Prabhakar S, Agarwal R. Clinical profile and outcome of myasthenic crisis in a tertiary care hospital: A prospective study. *Ann Indian Acad Neurol.* 2013;16(2):203–7.
125. Spillane J, Hirsch NP, Kullmann DM, Taylor C, Howard RS. Myasthenia gravis - treatment of acute severe exacerbations in the intensive care unit results in a favourable long-term prognosis. *Eur J Neurol.* 2014;21(1):171–3.
126. Thomas CE, Mayer SA, Gungor Y, Swarup R, Webster EA, Chang I, et al. Myasthenic crisis: clinical features, mortality, complications, and risk factors for prolonged intubation. *Neurology.* 1997;48(5):1253–60.
127. Kaminski HJ, Kusner LL, Wolfe GI, Aban I, Minisman G, Conwit R, et al. Biomarker development for myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1275(1):101–6.
128. AAEM Quality Assurance Committee. American Association of Electrodiagnostic Medicine. Practice parameter for repetitive nerve stimulation and single fiber EMG evaluation of adults with suspected Myasthenia Gravis or Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Muscle and Nerve.* 2001;24:1236–8.
129. Meriggioli MN, Sanders DB. Advances in the diagnosis of neuromuscular junction disorders. *Am J Phys Med Rehabil.* 2005;84(8):627–38.

130. Pascuzzi RM. The edrophonium test. *Semin Neurol.* 2003;23(1):83–8.
131. Lerner AJ. The place of the ice pack test in the diagnosis of myasthenia gravis. *Int J Clin Pract.* 2004;58(9):887–8.
132. Reddy AR, Backhouse OC. "Ice-on-eyes", a simple test for myasthenia gravis presenting with ocular symptoms. *Practical neurology.* 2007;7(2):109–11.
133. Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1985;48(12):1246–52.
134. 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.
135. Pauley KM, Cha S, Chan EKL. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009;32(3-4):189–94.
136. Friedländer MR, Lizano E, Houben AJ, Bezdan D, Báñez-Coronel M, Kudla G, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol.* 2014;15(4):R57.
137. Chen PY, Meister G. microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biol Chem.* 2005;386(12):1205–18.
138. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* 2009;136(2):215–33.
139. Liang H, Gong F, Zhang S, Zhang CY, Zen K, Chen X. The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014;5(2):285–300.
140. Singh RP, Massachi I, Manickavel S, Singh S, Rao NP, Hasan S, et al. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2013;12(12):1160–5.
141. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):271–82.
142. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
143. Peláez N, Carthew RW. Biological Robustness and the Role of MicroRNAs. A Network Perspective. *Curr Top Dev Biol.* 2012;99:237–55.
144. Kroesen B-J, Teteloshvili N, Smigielska-Czepiel K, Brouwer E, Boots AMH, van den Berg A, et al. Immuno-miRs: Critical regulators of T-cell development, function and ageing. *Immunology.* 2015; 144(1):1–10.
145. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2013;774:1–20.
146. Fernández-Hernando C, Ramírez CM, Goedeke L, Suárez Y. MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2):178–85.
147. Dimmeler S, Nicotera P. MicroRNAs in age-related diseases. *EMBO Molecular Medicine.* 2013;5:180–90.
148. Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:265.
149. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008;3(11):e3694.
150. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.* Elsevier Ireland Ltd; 2011;80(2):193–208.

1 ■ INTRODUCCIÓN

151. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997–1006.
152. Jiang L, Cheng Z, Qiu S, Que Z, Bao W, Jiang C, et al. Altered let-7 expression in Myasthenia gravis and let-7c mediated regulation of IL-10 by directly targeting IL-10 in Jurkat cells. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(2):217–23.
153. Cheng Z, Qiu S, Jiang L, Zhang A, Bao W, Liu P, et al. MiR-320a is downregulated in patients with Myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *J Clin Immunol*. 2013;33(3):567–76.
154. Wang J, Zheng S, Xin N, Dou C, Fu L, Zhang X, et al. Identification of novel microRNA signatures linked to experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis: Down-regulated mir-145 promotes pathogenic th17 cell response. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(5):1287–302.
155. Lu J, Yan M, Wang Y, Zhang J, Yang H, Tian F, et al. Altered expression of miR-146a in myasthenia gravis. *Neurosci Lett*. 2013;555:85–90.
156. 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.
157. Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Illa I. Treatment strategies for myasthenia gravis. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(8):1329–42.
158. Punga AR, Flink R, Askmark H, Ståhlberg E V. Cholinergic neuromuscular hyperactivity in patients with myasthenia gravis seropositive for MuSK antibody. *Muscle and Nerve*. 2006;34(1):111–5.
159. Pascuzzi RM, Coslett HB, Johns TR. Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients. *Ann Neurol*. 1984;15(3):291–8.
160. Sghirlanzoni A, Peluchetti D, Mantegazza R, Fiacchino F, Cornelio F. Myasthenia gravis: prolonged treatment with steroids. *Neurology*. 1984;34(2):170–4.
161. 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.
162. Evoli A, Batocchi AP, Palmisani MT, Lo Monaco M, Tonali P. Long-term results of corticosteroid therapy in patients with myasthenia gravis. *Eur Neurol*. 1992;32(1):37–43.
163. Schneider-Gold C, Gajdos P, Toyka K V, Hohlfeld RR. Corticosteroids for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(2):CD002828.
164. Sussman J, Farrugia ME, Maddison P, Hill M, Leite MI, Hilton-Jones D. Myasthenia gravis: Association of British Neurologists' management guidelines. *Pract Neurol*. 2015;15(3):199–206.
165. Witte AS, Cornblath DR, Parry GJ, Lisak RP, Schatz NJ. Azathioprine in the treatment of myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 1984;15(6):602–5.
166. 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(8):449–53.
167. Kissel JT, Levy RJ, Mendell JR, Griggs RC. Azathioprine toxicity in neuromuscular disease. *Neurology*. 1986;36(1):35–9.
168. Tindall RS, Rollins JA, Phillips JT, Greenlee RG, Wells L, Belendiuk G. Preliminary results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *N Engl J Med*. 1987;316(12):719–24.

- 169.** Tindall RS, 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.
- 170.** Ciafaloni E, Nikhar NK, Massey JM, Sanders DB. Retrospective analysis of the use of cyclosporine in myasthenia gravis. *Neurology.* 2000;55(3):448–50.
- 171.** Chaudhry V, Cornblath DR, Griffin JW, O'Brien R, Drachman DB. Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases. *Neurology.* 2001;56(1):94–6.
- 172.** 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.
- 173.** Sanders DB. A trial of mycophenolate mofetil with prednisone as initial immunotherapy in myasthenia gravis. *Neurology.* 2008;71(6):394–9.
- 174.** Sanders DB, Hart IK, Mantegazza R, Shukla SS, Siddiqi ZA, De Baets MH V, et al. An international, phase III, randomized trial of mycophenolate mofetil in myasthenia gravis. *Neurology.* 2008;71(6):400–6.
- 175.** Ponseti JM, Gamez J, Azem J, López-Cano M, Vilallonga R, Armengol M. Tacrolimus for myasthenia gravis: A clinical study of 212 patients. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1132:254–63.
- 176.** 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. *European neurology.* 2005;53(3):146–50.
- 177.** Hart IK, Sathasivam S, Sharshar T. Immunosuppressive agents for myasthenia gravis. *Cochrane database Syst Rev.* 2007;(4):CD005224.
- 178.** 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.
- 179.** Drachman DB, Adams RN, Hu R, Jones RJ, Brodsky R a. Rebooting the immune system with high-dose cyclophosphamide for treatment of refractory myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:305–14.
- 180.** Iorio R, Damato V, Alboini PE, Evoli A. Efficacy and safety of rituximab for myasthenia gravis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol.* 2014;1115–9.
- 181.** Illa I. IVIg in myasthenia gravis, Lambert Eaton myasthenic syndrome and inflammatory myopathies: current status. *J Neurol.* 2005;252 Suppl :14–8.
- 182.** Gelfand EW. Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 2012;367(21):2015–25.
- 183.** Nagelkerke SQ, Kuijpers TW. Immunomodulation by IVIg and the Role of Fc-Gamma Receptors: Classic Mechanisms of Action after all? *Front Immunol.* 2015;5:674.
- 184.** 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.
- 185.** Gajdos P, Chevret S, Toyka K. Intravenous immunoglobulin for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(1):CD002277.
- 186.** Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2000;55(1):7–15.
- 187.** Mehta S. Neuromuscular disease causing acute respiratory failure. *Respir Care.* 2006;51(9):1016–21; discussion 1021–3.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS 1:

Existe un perfil característico de miRNAs circulantes en el suero de pacientes con Miastenia Gravis. Dada la fácil obtención y la gran estabilidad de los miRNAs en suero, pueden resultar de utilidad como biomarcadores de esta patología autoinmune.

Objetivos:

- ▶ Determinar el perfil de miRNAs circulantes en el suero de pacientes con Miastenia Gravis autoinmune.
- ▶ Analizar si existe un perfil específico de estos miRNA para cada subgrupo de pacientes o en función del tratamiento recibido.

HIPÓTESIS 2:

Las situaciones de riesgo vital son frecuentes en los pacientes con MG. La edad y el desencadenante infeccioso son marcadores para una evolución tórpida y una peor respuesta al tratamiento.

Objetivos:

- ▶ Describir la frecuencia y características de las situaciones de riesgo vital en pacientes con MG incluidos en el registro nacional de enfermedades neuromusculares (NMD-ES).
- ▶ Analizar los marcadores demográficos, clínicos y inmunológicos que determinan el pronóstico de estos pacientes.

Trabajos publicados

ARTÍCULO 1

Analysis of serum miRNA profiles of myasthenia gravis patients

Nogales-Gadea G, Ramos- Fransi A, Suárez-Calvet X, Navas M, Rojas-García R, Mosquera JL, Díaz-Manera J, Querol L, Gallardo E, Illa I.

PLoS ONE 2014 Mar 17; 9 (3): e91927. doi:10.1371/journal.pone.0091927.

ARTÍCULO 1: Analysis of serum miRNA profiles of myasthenia gravis patients

Autores: Nogales-Gadea G, Ramos- Fransi A, Suárez-Calvet X, Navas M, Rojas-García R, Mosquera JL, Díaz-Manera J, Querol L, Gallardo E, Illa I. Publicado en PLoS ONE 2014 Mar 17; 9 (3): e91927. doi:10.1371/journal.pone.0091927.

Factor de impacto: 3.234. Primer cuartil.

Introducción:

Los miRNAs son pequeñas moléculas no codificantes que actúan regulando un gran número de genes. En los últimos años se han propuesto como biomarcadores en diferentes patologías, incluyendo algunas enfermedades autoinmunes como la MG, aunque el perfil de miRNAs circulantes en estos pacientes no había sido descrito. En este estudio nos propusimos determinar el perfil de miRNAs circulantes en suero de pacientes con Miastenia Gravis y analizar si existía un perfil específico en cada subgrupo de pacientes (EoMG, LoMG y MG asociada a timoma) y en función del tratamiento, para valorar su utilidad como biomarcadores.

Síntesis de metodología, resultados y discusión:

Realizamos un primer estudio en una cohorte inicial que incluía sueros de 15 pacientes con MG y Ac antiAChR (5 EoMG, 5 LoMG, 5 MG asociada a timoma) y 5 controles sanos (**Tabla 1, Artículo 1**). Los sueros de pacientes con MG habían sido extraídos antes de recibir cualquier tipo de tratamiento inmunosupresor o de haberse realizado una timectomía en los pacientes con timoma, y en ningún caso los pacientes presentaban comorbilidades importantes como cáncer u otras enfermedades autoinmunes.

El RNA total del suero se extrajo mediante el mirVana PARIS kit según el protocolo de Applied Biosystems. La transcripción reversa se realizó con el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription de la misma compañía en combinación con Megaplex RT human Primers Pool A (Invitrogen). Cada muestra se pre-amplificó usando el Megaplex PreAmp Primers pool (Applied Biosystems). Los productos pre-amplificados se cargaron en el Taqman array microfluidic cards Human MicroRNA Array A v2.0 para el estudio de 381 miRNAs maduros.

3 ■ TRABAJOS PUBLICADOS

El perfil global de miRNAs se analizó mediante una PCR cuantitativa con el sistema 7900HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). El análisis se llevó a cabo mediante el software SDS 2.4. Los valores de referencia y los umbrales se determinaron para cada miRNA mediante el RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems). Para evitar resultados imprecisos se excluyeron aquellos miRNAs con valores bajos ($Ct > 34$). Para la normalización se usó el método delta Ct al ser el más ampliamente usado y porque que no mostró diferencias con el método geométrico. El cálculo del delta Ct se realizó en base a la media de 3 miRNAs (U6 snRNA, miR-30b y miR-483-5p), al ser éstos estables en las diferentes muestras y presentar unos buenos niveles de detección. El análisis estadístico para determinar si existían diferencias en los niveles de miRNAs del array se realizó mediante una técnica específica para cálculos de microarrays, similar al ANOVA. Los valores P fueron ajustados por el método False Discovery Rate para múltiples comparaciones, y se consideró significativo un valor $p < 0.05$. Los datos crudos del Taqman array se exponen en la **Tabla Suplementaria 1**.

Finalmente se incluyeron un total de 93 miRNAs en el análisis. En 32 miRNAs se detectó una diferencia de niveles estadísticamente significativa entre los pacientes con MG y los controles (**Figura 1, Artículo 1**). Algunas diferencias se observaron sólo en determinados subgrupos de pacientes (**Tabla Suplementaria 2**), de forma que en el subgrupo EoMG el miR518d se encontraba en niveles más elevados comparado con los controles, y let7g, miR192, miR24, miR15b, let7e, miR221, miR652, miR345, miR20b, miR140 y miR331 mostraban niveles inferiores. En el grupo LoMG se encontraron niveles inferiores en los siguientes miRNAs comparados con los controles: miR375, miR122, miR185, miR140-3p, miR885-5p, miR486, miR324-3p y miR16. En el grupo de pacientes con MG asociada a timoma no se encontraron diferencias significativas al comparar con el grupo control.

Posteriormente realizamos un estudio en una cohorte de validación que incluía 46 pacientes con MG y Ac antiAChR (17 EoMG, 22 LoMG, 7 MG asociada a timoma) (**Tabla 2, Artículo 1**) y 17 controles sanos, y analizamos específicamente 8 de los miRNAs cuyos niveles diferían en los diversos grupos. En esta cohorte de validación se incluyeron pacientes sin tratamiento

previo (n =23), pacientes en tratamiento con corticoides (n=10), pacientes en tratamiento con corticoides junto a otros inmunosupresores (n=7) y pacientes en tratamiento con otros inmunosupresores diferentes a los corticoides únicamente (n=6), y se determinó si los pacientes habían sido timectomizados antes de la extracción. Los 8 miRNAs analizados se seleccionaron en base a su significación estadística en el análisis previo y puesto que no se habían relacionado previamente con la enfermedad. Se eligieron 3 miRNAs del grupo EOMG (miR192, miR15b, miR20b) y 5 miRNAs del LoMG (miR375, miR122, miR185, miR140-3p, miR885-5p). Los miRNAs individuales se estudiaron por duplicado mediante el ABI 7900HT. Los valores relativos fueron calculados según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se normalizaron según el miR483-5p. El análisis estadístico se realizó con métodos no paramétricos (Mann-Whitney o Kruskal Wallis), y se consideró significativo un valor $p < 0.05$. En las **Tablas Suplementarias 3 y 4** se recogen los valores crudos del análisis de miRNAs individuales.

Siete miRNAs mostraron niveles inferiores en los pacientes con MG comparados con los controles (**Figura 2, Artículo 1**). Únicamente el miR15b se encontró en niveles más bajos en los tres grupos. Los miR122, miR140-3p, miR185, miR192 y miR20b se encontraron bajos en el grupo EoMG y el LoMG. El miR885-5p mostró niveles bajos sólo en LoMG. Por tanto, aunque inicialmente se detectaron diferencias en el perfil de miRNAs de cada subgrupo de pacientes, esto no se confirmó en el análisis posterior. Estos hallazgos sugieren que en diferentes subtipos de MG puede existir un mecanismo fisiopatológico común, a pesar de las diferencias que existen respecto a la edad de debut, sexo y asociación con patología tímica.

Aunque los miRNAs circulantes han sido propuestos como biomarcadores en algunos tipos de cáncer^{1,2}, los pacientes con timoma de nuestro estudio no mostraron un perfil característico de miRNAs. Una posible explicación es que no alcanzaron la significación estadística debido al pequeño tamaño de la muestra. Otra opción es que los miRNAs tímicos tengan una baja contribución al pool de miRNAs en sangre y por tanto el suero no sea una muestra correcta para su estudio, o bien que no se incluyeran los miRNAs derivados del timo en el análisis.

Respecto al tratamiento, al evaluar los niveles de miRNAs en los pacientes timectomizados (n=17) no se encontraron diferencias significativas respecto a los no timectomizados (**Figura 3, Artículo 1**). Así mismo, tampoco se detectaron diferencias en los niveles de miRNAs entre los pacientes bajo diferentes regímenes terapéuticos (corticoides solos, corticoides con otro inmunosupresor, otro inmunosupresor solo), ni comparados con aquellos que no recibían tratamiento alguno (**Figura 4, Artículo 1**). Estos resultados sugieren que los regímenes terapéuticos usados no actúan sobre la expresión de los miRNAs analizados.

Los niveles bajos de estos miRNAs circulantes pueden ser resultado de una menor liberación a la sangre o bien de un mayor captación por los tejidos diana. Aunque los estudios previos publicados sobre el perfil de miRNAs de células mononucleares en sangre periférica se habían focalizado en otros miRNAs diferentes, también detectaron unos niveles más bajos en 3 de nuestros miRNAs: miR15b, miR20b, miR185^{3,4}. Por tanto, es posible que parte de los miRNAs circulantes provengan de las células mononucleares, aunque deben existir otras células que contribuyan a la liberación del resto de miRNAs.

La forma en la que estos miRNAs pueden verse implicados en la fisiopatología de la MG no está clara. El miR15b puede inhibir la expresión del oncogen BCL2 (“B-cell lymphoma-2” anti-apoptótico) en diferentes células del organismo⁵, y desempeña un papel importante en el control de la homeostasis de las células B. En pacientes con MG se ha demostrado que BCL2 se encuentra sobre-regulado de forma anómala en los centros germinales tímicos donde las células B auto-reactivas habitualmente experimentan la apoptosis⁶, lo que podría derivar en un error en la selección negativa de estas células. El miR20b también puede reducir la expresión de BCL2⁷. El miR-185 tiene como diana la BTK (Bruton Tyrosine Kynase), un efector de señal del receptor de células B. En ratones se ha observado que si las células B tienen niveles bajos de miR185 producen autoanticuerpos a títulos altos⁸. Aunque nuestros hallazgos se basan en miRNAs circulantes, estos tres miRNAs también han sido descritos en niveles bajos en las células mononucleares sanguíneas^{3,4}, por lo que posiblemente influyan en la patogénesis de la MG al regular la supervivencia de las células B y la producción de autoanticuerpos.

El miR122 se encuentra altamente expresado en el hígado, y se ha propuesto como biomarcador circulante para diferentes patologías hepáticas⁹⁻¹⁴. Este miRNA también se expresa en otros tejidos (cerebro, corazón, riñón, pulmón, ovario, testículo y timo) que a su vez pueden contribuir al pool de miR122 circulante¹⁵. Algunos estudios in vitro han demostrado que miR122 regula el NFATC1 (nuclear factor of activated T cells calcium dependent) y NCAM1 (neuronal cell adhesion molecule 1)¹⁴. Ambas moléculas están relacionadas con el sistema inmune y se encuentran implicadas en la proliferación de células T y B después del estímulo antigénico¹⁶, y en la regulación de las células natural killer y de subpoblaciones de células T^{17,18}.

Conclusiones:

Nuestro estudio describe por primera vez el perfil de miRNAs circulantes en pacientes con MG, que es común en diferentes subgrupos de pacientes. Encontramos una alteración en 7 miRNAs circulantes: miR15b, miR122, miR140-3p, miR185, miR192, miR20b, miR885-5p, que se encuentran en niveles bajos en los pacientes con MG comparados con los controles. Puesto que EoMG y LoMG presentan un perfil común de miRNAs esto sugiere que, al menos en parte, comparten un mismo mecanismo fisiopatológico. No se detectó un perfil característico de miRNAs en los pacientes con timoma, ni tampoco en función del tratamiento recibido.

Por tanto, el estudio de los miRNAs circulantes en pacientes con MG puede aportar nueva información sobre la patogenia de esta enfermedad, aunque son necesarios nuevos estudios para determinar si estos miRNAs son útiles como biomarcadores clínicos o de respuesta terapéutica.

Información adicional:

Simultáneamente a la publicación de nuestro trabajo, un grupo de Suecia describió que los miR150-5p y de miR21-5p se encontraban en niveles más altos en el suero de pacientes con MG comparados con controles, y que el miR27a se encontraba en niveles más bajos¹⁹. Trabajos posteriores del mismo grupo corroboraron que el miR150-5p y que el miR21-5p

3 ■ TRABAJOS PUBLICADOS

se encontraban en niveles más altos en el suero de pacientes con MG no tratados, comparados con controles sanos y con pacientes afectados de otras enfermedades autoinmunes²⁰. Además, los niveles de estos miRNAs en pacientes con MG se reducían después de recibir tratamiento inmunosupresor, aunque los niveles de miRNAs no se correlacionaban con el estado clínico. Ambos miRNAs tienen un papel regulador sobre las células T²¹; el miR150-5p se encuentra implicado en la maduración/diferenciación de células T, el desarrollo de células NK y probablemente en la alteración tímica de algunos pacientes con MG^{19,22}, y el miR21 está implicado en procesos de apoptosis, proliferación y migración de células T^{23,24}. El miR27-3p, implicado en la actividad de células NK, no mostró diferencias significativas en los estudios posteriores²⁰.

Estos hallazgos difieren de los resultados presentados en nuestro trabajo, aunque las causas no se conocen. Posiblemente se deban a diferencias en la muestra, ya que nuestros pacientes fueron cuidadosamente seleccionados pre-tratamiento y se dividieron en grupos bien definidos. También es probable que exista una diferencia metodológica en los métodos de detección y normalización de estos miRNAs circulantes, lo que podría dar lugar a esta divergencia de resultados.

Bibliografía Artículo 1

1. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997–1006.
2. Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW. Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer*. 2012;3(1):432–48.
3. Jiang L, Cheng Z, Qiu S, Que Z, Bao W, Jiang C, et al. Altered let-7 expression in Myasthenia gravis and let-7c mediated regulation of IL-10 by directly targeting IL-10 in Jurkat cells. *Int Immunopharmacol*. 2012;14(2):217–23.
4. Cheng Z, Qiu S, Jiang L, Zhang A, Bao W, Liu P, et al. MiR-320a is downregulated in patients with Myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *J Clin Immunol*. 2013;33(3):567–76.
5. Li G, Miskimen KL, Wang Z, Xie XY, Brenzovich J, Ryan JJ, et al. STAT5 requires the N-domain for suppression of miR15/16, induction of bcl-2, and survival signaling in myeloproliferative disease. *Blood*. 2010;115(7):1416–24.
6. Shiono H, Fujii Y, Okumura M, Takeuchi Y, Inoue M, Matsuda H. Failure to down-regulate Bcl-2 protein in thymic germinal center B cells in myasthenia gravis. *Eur J Immunol*. 1997;27(4):805–9.
7. Beveridge NJ, Tooney P a., Carroll AP, Tran N, Cairns MJ. Down-regulation of miR-17 family expression in response to retinoic acid induced neuronal differentiation. *Cell Signal*. 2009;21(12):1837–45.
8. Belver L, de Yébenes VG, Ramiro AR. MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunity*. 2010;33(5):713–22.
9. Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol*. 2010;84(13):6615–25.
10. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4402–7.
11. Shifeng H, Danni W, Pu C, Ping Y, Ju C, Liping Z. Circulating Liver-Specific miR-122 as a Novel Potential Biomarker for Diagnosis of Cholestatic Liver Injury. *PLoS One*. 2013;8(9):1–7.
12. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem*. 2010;56(12):1830–8.
13. Köberle V, Kronenberger B, Pleli T, Trojan J, Imelmann E, Peveling-Oberhag J, et al. Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*. 2013;49(16):3442–9.
14. Tsai WC, Hsu PWC, Lai TC, Chau GY, Lin CW, Chen CM, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor MicroRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(5):1571–82.
15. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, et al. Plasma microRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem*. 2009;55(11):1977–83.
16. Hock M, Vaeth M, Rudolf R, Patra AK, Pham DAT, Muhammad K, et al. NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. *J Immunol*. 2013;190(5):2345–53.
17. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*. 1989;169(6):2233–8.

3 ■ TRABAJOS PUBLICADOS

18. Almehmadi M, Flanagan BF, Khan N, Alomar S, Christmas SE. Increased numbers and functional activity of CD56+ T cells in healthy cytomegalovirus positive subjects. *Immunology*. 2014;142(2):258–68.
19. Punga T, Le Panse R, Andersson M, Truffault F, Berrih-Aknin S, Punga AR. Circulating miRNAs in myasthenia gravis: miR-150-5p as a new potential biomarker. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014;1(1):49–58.
20. Punga AR, Andersson M, Alimohammadi M, Punga T. Disease specific signature of circulating miR-150-5p and miR-21-5p in myasthenia gravis patients. *J Neurol Sci [Internet]*. Elsevier B.V.; 2015;356(1-2):90–6.
21. Kroesen B-J, Teteloshvili N, Smigielska-Czepiel K, Brouwer E, Boots AMH, van den Berg A, et al. Immuno-miRs: Critical regulators of T-cell development, function and ageing. *Immunology*. 2015;144(1):1-10.
22. Ghisi M, Corradin A, Basso K, Frasson C, Serafin V, Mukherjee S, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: Targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood*. 2011;117(26):7053–62.
23. Salaun B, Yamamoto T, Badran B, Tsunetsugu-Yokota Y, Roux A, Baitsch L, et al. Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8+ T cell subsets. *J Transl Med*. 2011;9:44.

Analysis of Serum miRNA Profiles of Myasthenia Gravis Patients

Gisela Nogales-Gadea^{1,2*}, Alba Ramos-Fransi^{1,2}, Xavier Suárez-Calvet^{1,2}, Miquel Navas^{1,2}, Ricard Rojas-García^{1,2}, Jose Luis Mosquera³, Jordi Díaz-Manera^{1,2}, Luis Querol^{1,2}, Eduard Gallardo^{1,2}, Isabel Illa^{1,2*}

1 Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** CIBER de enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **3** Department of Statistics, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease characterized by the presence of autoantibodies, mainly against the acetylcholine receptor (AChR). The mechanisms triggering and maintaining this chronic disease are unknown. miRNAs are regulatory molecules that play a key role in the immune system and are altered in many autoimmune diseases. The aim of this study was to evaluate miRNA profiles in serum of 61 AChR MG patients. We studied serum from patients with early onset MG (n=22), late onset MG (n=27) and thymoma (n=12), to identify alterations in the specific subgroups. In a discovery cohort, we analysed 381 miRNA arrays from 5 patients from each subgroup, and 5 healthy controls. The 15 patients had not received any treatment. We found 32 miRNAs in different levels in MG and analysed 8 of these in a validation cohort that included 46 of the MG patients. miR15b, miR122, miR-140-3p, miR185, miR192, miR20b and miR-885-5p were in lower levels in MG patients than in controls. Our study suggests that different clinical phenotypes in MG share common altered mechanisms in circulating miRNAs, with no additional contribution of the thymoma. MG treatment intervention does not modify the profile of these miRNAs. Novel insights into the pathogenesis of MG can be reached by the analysis of circulating miRNAs since some of these miRNAs have also been found low in MG peripheral mononuclear cells, and have targets with important roles in B cell survival and antibody production.

Citation: Nogales-Gadea G, Ramos-Fransi A, Suárez-Calvet X, Navas M, Rojas-García R, et al. (2014) Analysis of Serum miRNA Profiles of Myasthenia Gravis Patients. PLoS ONE 9(3): e91927. doi:10.1371/journal.pone.0091927

Editor: Guher Saruhan-Direskeneli, Istanbul University, Turkey

Received: November 15, 2013; **Accepted:** February 17, 2014; **Published:** March 17, 2014

Copyright: © 2014 Nogales-Gadea et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This project was supported with a research grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Fondo de Investigaciones [FIS] Intrasalud; 09/1964; principal investigator, I.I.). GNG and LQ are supported by FIS CD10/00027 and FIS CM09/00017 grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Gisela Nogales-Gadea is editor of PLoS ONE. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE editorial policies and criteria.

* E-mail: gnogales@santpau.cat (GNG); illa@santpau.cat (II)

Introduction

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease leading to fluctuating muscle weakness and fatigability. Patients with MG have been reported to have autoantibodies to the acetylcholine receptor (AChR), to MuSK or to LRP4 proteins [1,2,3]. Most MG patients, however, have circulating antibodies to AChR [4]. These antibodies are of the IgG subtype and their synthesis requires interaction between activated T and B cells [5]. Suggested mechanisms leading to autoantibody production include errors in antigen presentation or recognition [6,7,8], tolerance against self-antigens [9], and proliferation/apoptosis regulation of these immune cells [10,11].

MG patients with AChR antibodies are clinically heterogeneous [12]. Age at onset varies, and patients can be divided into early onset MG (EOMG), when symptoms appear before 50 years of age, or in late onset MG (LOMG), when they appear after 50 years [13]. Thymic involvement is also variable, more than 80% of EOMG patients have thymic hyperplasia [14] and 10–15% of MG patients have thymoma [15]. Thymectomy is used as a therapeutic intervention in EOMG [16] and in patients with thymoma. Response to treatment is also diverse. Most patients respond to steroids or other immunosuppressors, but some patients are refractory to standard therapy [15]. The heterogeneity is not only clinical and therapeutic. It may also involve the AChR

antibody titers, which may be high or low independently of the patient's clinical status [17]. These findings suggest that the pathogenic mechanisms involved in each patient subgroup are different. No biomarkers are available, however, to predict such heterogeneity.

miRNAs are small, non-coding regulatory molecules that modify gene expression by binding to the 3' untranslated region of their target messenger RNAs [18]. These molecules are key in several cellular functions, and changes in their expression patterns have been associated with several diseases [19,20,21,22]. miRNAs play a diverse role in the immune system, participating in immune cell development, germinal center response, generation of Ig class-switched plasma cells, and response to toll-like receptor stimulus [23]. All of these mechanisms are potentially involved in the development of AChR antibodies. miRNA expression profiles have been previously studied in peripheral blood mononuclear cells of MG patients [24,25] and let-7c and miR320 have been found downregulated. Functional studies have shown that these two miRNAs can contribute to MG induction or progression by regulating the expression of some cytokines. A recent study has shown that miR146a is upregulated in patients, and it can be regulating genes as CD40, CD80, TLR4 and NFκB [26].

Circulating miRNAs have been extensively studied from their discovery [27,28], as they have been found altered in different

pathological conditions [28,29,30,31]. In circulation, they are in microvesicles released by cells [32,33,34] or in association with proteins complexes [35,36], and their presence in the blood has been attributed to release by tissue injury [37] or shedding of cell plasma membrane to the circulation [38]. Their origin is diverse and they can be released by blood cells [39,40], organs of the body [37,41,42,43,44] and tumors [45,46,47]. Their function seems to be related with intercellular or iterorgan communication [38], because microvesicles containing them can reach their target host and accomplish their function [39,48,49]. Due to miRNA stability in fresh or cryopreserved samples [27,50] and their easy obtention from blood, they can be easily studied, monitored and used as biomarkers for diagnosis [51,52], prognosis [52,53], or treatment [54,55]. However, serum miRNAs have not been studied in MG.

We studied miRNAs in serum from patients with AchR MG, analyzing three subgroups: patients with EOMG, LOMG, and thymoma. We identified 7 miRNAs with low levels in MG patients when compared with healthy controls. These miRNAs low levels were not modified by MG subgroup, steroid treatment or thymectomy.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study was approved by the Institutional Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and performed in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research. All participants gave written informed consent for inclusion.

Patient information

All patients with MG and AChR antibodies included in this study were followed in our neurology unit. Healthy subjects were used as controls.

Fifteen MG patients were selected for a discovery cohort: 5 early onset myasthenia gravis (EOMG), 5 late onset myasthenia gravis (LOMG) and 5 thymoma patients. We excluded patients with other severe concomitant diseases. Serum from all patients was collected before any immunotherapy was started and before thymectomy in the case of patients with thymoma. Five healthy subjects were used as controls. Epidemiological data are provided in Table 1.

A validation cohort with 46 additional MG patients was used to analyze miRNAs that showed different levels between MG patients and controls. MG patients included 17 EOMG, 22 LOMG and 7 thymoma patients (Table 2). For this second miRNA analysis, we included patients without treatment ($n = 23$), patients with steroid treatment ($n = 10$), patients with steroid plus other immunosuppressor treatment ($n = 7$), and patients with other immunosuppressor treatment only ($n = 6$). We recorded whether or not patients were thymectomized at the moment of sera collection. Seventeen healthy controls were also analysed.

Sample collection

Serum samples were collected in BD Vacutainer SST tubes (BD, New Jersey, NJ, EEUU). Tubes were inverted 5 times to mix silicone and micronized silica particles that accelerate clotting formation. Tubes were kept in vertical position for 30 minutes to allow clot formation and centrifuged at 1300 g for 10 minutes. A clear separation between serum specimens and clot was formed and serum fractions were aliquoted and stored at -80°C until used.

Table 1. Subjects analyzed in the discovery cohort.

Early onset (EOMG)	Age at onset	Sex
	33	M
	41	M
	34	F
	36	F
	31	F
Average	35	
Late onset (LOMG)	Age at onset	Sex
	78	M
	81	M
	83	M
	83	F
	79	F
Average	81	
Thymoma	Age at onset	Sex
	50	M
	71	F
	67	F
	59	F
	49	M
Average	59	
Healthy subjects	Age	Sex
	60	F
	35	F
	70	F
	80	M
	40	M
Average	57	

M = male; F = female.
doi:10.1371/journal.pone.0091927.t001

miRNA profiling

Total RNA was extracted using the mirVana PARIS kit according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reverse transcription was performed using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in combination with the Megaplex RT human Primers Pool A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For each sample, the Megaplex reverse transcription product A was preamplified using the Megaplex PreAmp Primers pool (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The preamplification product was loaded onto the Taqman array microfluidic cards Human MicroRNA Array A panel v2.0, for the study of 381 mature miRNAs. Global miRNA profiling was performed by real-time quantitative PCR on the 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Individual assays were also studied: miR15b, miR20b, miR122, miR-140-3p, miR-185, miR-192, miR-375, miR-483-5p and miR885-5P. The assays were performed in duplicate on the ABI 7900HT (Applied Biosystems, CA, USA) and the relative levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Serum miRNA Profiles in Myasthenia Gravis Patients

Table 2. MG patients studied in the validation cohort.

Early onset MG	Age at onset	Sex	Treatment	Thymectomy
	22	F	No	Yes
	42	F	No	No
	28	F	No	No
	20	F	No	No
	11	F	OI	Yes
	16	F	No	Yes
	13	F	No	No
	48	F	Cort	Yes
	28	F	Cort	No
	23	F	Cort	Yes
	16	F	OI	Yes
	40	M	Cort	No
	12	F	Cort + OI	No
	21	F	No	Yes
	25	F	Cort	Yes
	29	F	Cort	Yes
	34	F	No	Yes
<i>Average</i>	25			
Late onset MG	Age at onset	Sex	Treatment	Thymectomy
	77	F	No	No
	77	M	No	No
	80	F	No	No
	80	M	No	No
	78	M	No	No
	69	M	No	No
	65	M	No	No
	65	M	OI	Yes
	59	M	Cort + OI	No
	64	M	OI	No
	78	F	No	No
	73	M	OI	No
	63	M	No	No
	60	M	No	No
	81	F	No	No
	75	M	No	No
	59	M	Cort	No
	69	M	OI	No
	53	M	Cort + OI	No
	55	M	Cort + OI	No
	74	F	Cort	No
	53	M	No	No
<i>Average</i>	69			
Thymoma MG	Age at onset	Sex	Treatment	Thymectomy
	33	F	Cort + OI	Yes
	46	M	Cort	Yes
	33	M	Cort + OI	Yes
	44	M	No	Yes
	54	M	Cort	Yes
	14	F	Cort + OI	Yes

	62	F	No	No
<i>Average</i>	41			

M = male; F = female; No = No treatment/No thymectomy; Cort = corticosteroids; Other immunosuppressors = OI; Yes = Thymectomy. doi:10.1371/journal.pone.0091927.t002

Data analysis

Data analysis was obtained using SDS 2.4 software (Applied Biosystems). The baselines and thresholds were individually set up for each miRNA using the RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems). To avoid inaccurate results, low-detected miRNAs (Ct>34) were excluded from downstream analyses. Different types of quality checks were done for Taqman array following the methods developed by Heidi Dvinge (<http://bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/HTqPCR.html>). For the normalization we explored the possibility of using delta Ct method that is the most widely used [56], and geometric mean method because it is beneficial for miRNA studies [57]. After performing a Q-Q plot, a boxplots figure, a density plot and a PCA plot for each method, we observed that no significant differences were appreciated. Thus, we decided to use the delta Ct approach because it is the most used normalizing method. In order to normalize raw Ct values, we computed the delta Ct values based on the mean of U6 snRNA, miR-30b and miR-483-5p [58]. These three small RNAs showed stability across the samples and a good detection levels (Ct<27), two of the principal conditions for an appropriate endogenous control. MiRNAs were removed from the analysis when they showed more than 3 samples with “undetermined” or Ct values >34, or when the standard deviation was below the 20 percentile of all standard deviations. For the Taqman arrays, the analysis of differentially miRNAs levels was based on a technique similar to ANOVA specifically developed for microarray data analysis by Smith et al. [59] that can also be applied to qPCR data. P-values were adjusted for multiple comparisons following the false discovery rate correction [60]. The selection criteria followed for considering that microRNA levels were different between disease and control sera was p adjusted value <0.05. Namely, all the miRNAs whose p values were <0.05 after multiple comparison correction by False Discovery Rate. In the case of individual assays for miRNA analysis, the data was normalized only by miR483-5p. Raw data of the Taqman arrays and the qPCR studies is provided (Table S1). Mann-Whitney or Kruskal Wallis tests were used to determine significant differences in miRNA individual analysis (GraphPad Prism v5.0). In this case, the selection criteria followed for considering that miRNA levels were different was p value <0.05.

Results

Differential levels of miRNAs in the discovery cohort

After quality checks and filtering, 93 miRNAs were included in the analysis. Statistical analysis showed that 32 miRNAs showed different levels (p<0.05) between MG patients and healthy controls. Figure 1 shows heatmap with unsupervised clustering of delta Ct values of these 32 miRNAs.

When we compared the different subgroups of MG (EOMG, LOMG or thymoma) with healthy controls, some miRNAs were in different levels only in specific MG subgroups (Table S2). All these miRNAs presented a fold change >2. In the EOMG subgroup, miR518d was in high levels and let7g, miR-192, miR24, miR15b, let7e, miR221, miR652, miR-345, miR20b, miR-140 and miR331 were in low levels. We observed low levels of miRNAs specific for the LOMG subgroup: miR375, miR122, miR185, miR140-3p,

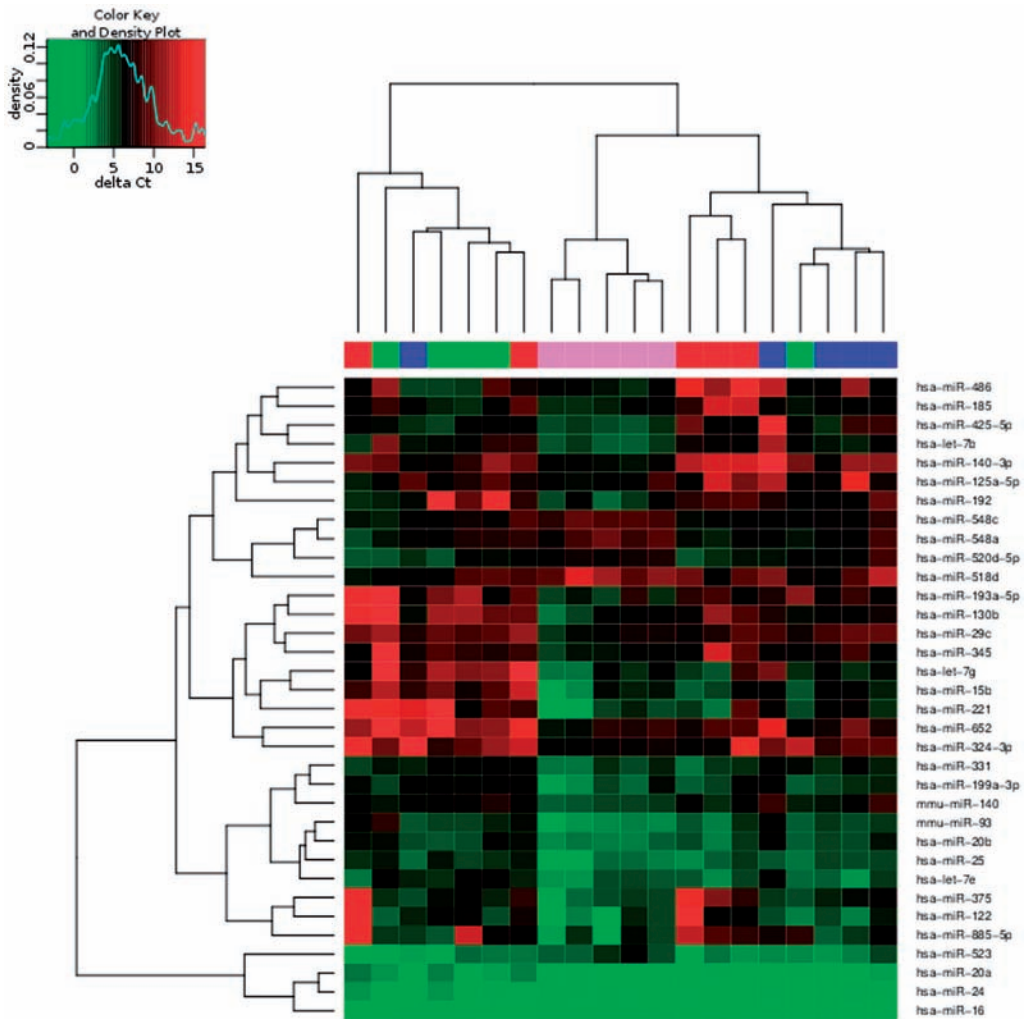


Figure 1. Unsupervised HeatMap showing deltaCt values of the miRNA in differential levels between MG patients and controls in the discovery cohort. Delta Ct value is the difference between Ct value of the target miRNA minus Ct value of the reference small RNAs. The scale at top indicates high delta Ct values (in red shades) and low delta Ct values (in green shades). All miRNAs with a p adjusted value <0.05 are shown. Early onset MG (green), late onset MG (red), thymoma MG (blue) and healthy controls (purple).
doi:10.1371/journal.pone.0091927.g001

miR-885-5p, miR486, miR324-3p and miR16. The subgroup of thymoma showed no differences in miRNAs when compared with healthy controls.

Analysis of the selected miRNAs in the validation cohort

Several miRNAs were selected for further analysis based on their statistical significance in the analysis, and because they had not been previously related to MG. For confirmation purposes we chose 3 miRNAs from the EOMG subgroup: miR15b, miR20b, miR-192; and 5 miRNAs from the LOMG subgroup: miR122,

miR-140-3p, miR-185, miR-375, and miR885-5P. These miRNAs were analyzed in the validation cohort. Seven miRNAs show lower levels in MG patients than in controls (Figure 2).

When considering MG subgroups (Figures 2), only miR15b was found low in the three groups: EOMG, LOMG and thymoma. For most miRNAs studied (miR122, miR140-3p, miR-185, miR-192 and miR20b), only EOMG and LOMG showed differences compared to controls. Levels in the thymoma group did not reach statistical significance, but the overall trend of the data recapit-

Serum miRNA Profiles in Myasthenia Gravis Patients

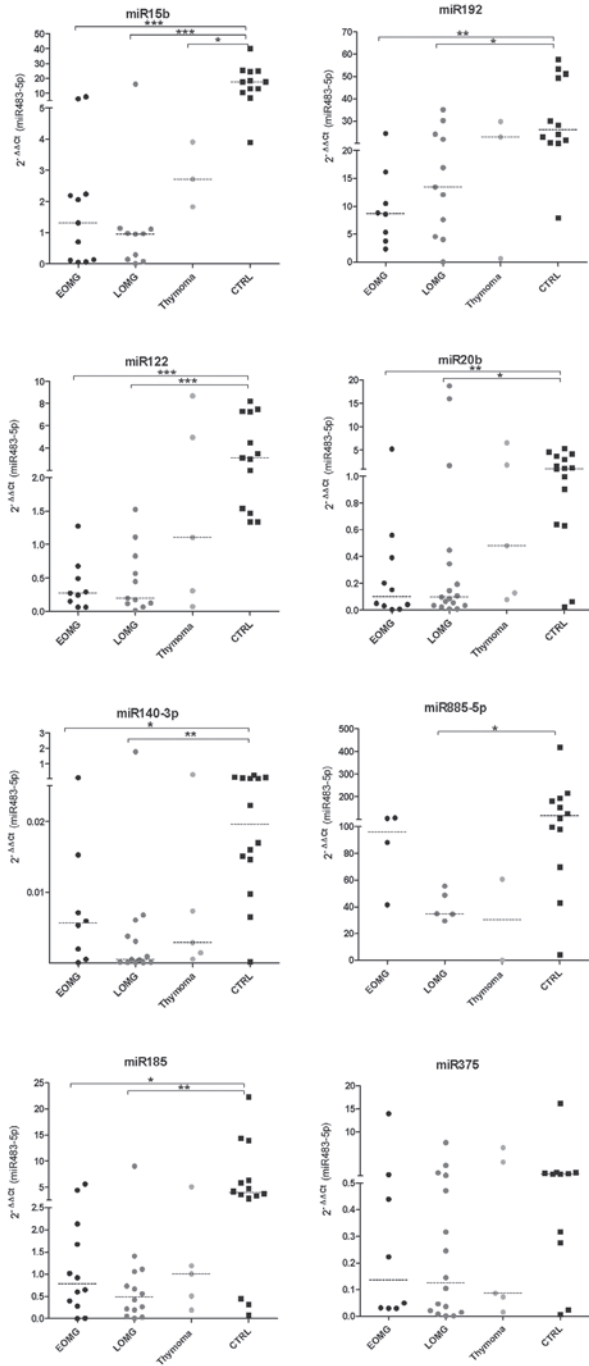


Figure 2. miR15b, miR122, miR140-3p, miR185, miR192, miR20b and miR885-5p show low levels in sera of MG patients. No differences were found for miR375. Graphs show relative quantification of the miRNAs in the 3 MG subtypes; EOMG = early onset MG; late onset MG; thymoma = thymoma MG; CTRL = healthy controls; *P<0.05; **P<0.01. doi:10.1371/journal.pone.0091927.g002

ulated the results of the other MG subgroups. Low levels of miR885-5p were only found in the LOMG.

Thymectomy and treatment effect in the differential levels of miRNAs

Thymectomy is standard treatment for patients with thymoma but it is also used as treatment in EOMG patients without thymoma [12]. Seventeen patients in our validation cohort had previously been thymectomized. We evaluated the effect of thymectomy in miRNA levels and observed no differences between patients with or without thymectomy (Figure 3). Twenty-three patients in our validation cohort were also receiving chronic immunosuppressive treatment. We classified patients as untreated, treated with steroids, treated with other immunosuppressive agents, or treated with steroids and other immunosuppressive agents. We observe no differences in miRNA levels between treated and untreated patients regardless of the treatment (Figure 4).

Discussion

Our study describes the presence of a miRNA profile that is common to all MG subgroups. We based our clinical phenotype classification in three main groups: EOMG, LOMG and thymoma. Fifteen patients were evaluated in a first attempt to identify specific miRNAs between the different subgroups and miR15b, miR122, miR-140-3p, miR185, miR192, miR20b, miR-885-5p and miR-385 were selected for a second analysis in a validation cohort of 46 patients. Although differences appeared in our initial analysis, when studying the additional cohort, we did not find significant differences. One of the studied miRNAs, miR15b, was in low levels in all three subtypes of MG. EOMG and LOMG subtypes shared deregulation of other 6 miRNAs. The miRNA in thymoma patients was similar to that in the other two subtypes, but it probably did not reach statistical significance due to the small number of patients in this group. Our study shows an alteration of the circulating levels of at least 7 miRNAs - miR15b, miR122, miR-140-3p, miR185, miR192, miR20b and miR-885-5p - found at low levels in MG patients.

In our attempt to identify specific miRNA profiles for each MG subtype we did not find differences among subtypes. EOMG and LOMG classify two groups of MG patients based on the age of onset, however, they differ in many other characteristics [61]. In the case of EOMG patients there is intrathymic lymphoid follicles and germinal centers [62], there are more women affected than men [63], and some patients also develop other autoimmune diseases [64]. In the case of LOMG, thymic abnormalities are rarely found [65], patients are predominantly male, antibodies against other proteins in the neuromuscular junction can also be found [63], and there is an increase of incidence in the last years of these patients [66]. These differences on clinical presentation are also in line with some findings that support differences in their underlying immune-mechanism [67,68]. Despite the MG diversity, some authors suggest that MG is a single condition constituting a continuous clinical spectrum with overlapping features [65,69]. In line with these last findings, our study shows that these two groups share alterations in their circulating miRNA profile.

Circulating miRNAs can be used as biomarker for diagnosis of different types of cancer [28,47]. In the case of the thymoma subtype, we expected to find some effect in miRNA levels due to the neoplastic process, but no differences were found when compared with healthy controls. Serum might not be a good sample to characterize thymus-derived miRNAs, either because its contribution to blood miRNAs was minor or because thymus-derived miRNAs were not included in our analysis.

The seven miRNAs with lower levels were not modified by thymectomy or MG treatment. Some studies have reported that steroids can modify the miRNA profile [70,71]. To avoid treatment bias, the initial miRNA analysis was done in untreated patients. In the validation cohort, we analyzed the effect of several treatments. MiRNA levels in MG patients remained low, regardless of the treatment. Interestingly, most of the patients belonged to the untreated or steroid treated group, and steroids did not modify the levels of the studied miRNAs. These results may indicate that common clinical interventions do not target the release of these circulating miRNAs in MG patients.

MiRNAs presence in circulation has been explained as a way of intercellular communication [47,72]. The finding of a subset of miRNAs with low abundance in circulation in serum MG can indicate different things: lower release of these miRNA to circulation or a higher uptake of these miRNAs by their targets. Little is known about how these miRNAs reach and act in their targets, but more studies address miRNAs cell release [38,39]. Blood cells are one of the contributors to the circulating miRNAs [31,73]. Previous analysis in MG patients in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) have defined profiles of differentially expressed miRNAs compared to healthy population [24,25]. Although their studies focused on other miRNAs, three of the miRNAs found in low levels in circulation in our MG patients - miR15b, miR20b and miR185 - were also found in low levels in PMBCs of MG patients in both analysis. Although a better approach would be to analyze PBMCs and serum from the same patients, these findings suggest that some of the miRNAs that we have found in low levels in circulation proceed from PBMCs. However, other cells should be contributing to the altered circulating profile of MG, because miR122, miR140-3p, miR192 and miR885-5p were not differentially expressed in PBMCs.

MiRNA-15b and miR20b are two of the miRNAs found at lower levels in MG patients. The genomic region that codes miR15b is commonly affected in more than 50% of the patients with chronic lymphocytic leukemia [74]. This miRNA functions as a tumor suppressor by inhibiting the expression of B-cell lymphoma-2 (BCL2) [75], and plays an important role in controlling B cell homeostasis. BCL2 also has regulatory domains for the inhibition of miR-20b [76]. BCL2 has been found to play some role in MG pathology, being up-regulated in germinal centers where autoreactive B cells normally undergo apoptosis [77]. Other of the lower circulating miRNAs found in our MG patients is miR-185. This miR is highly expressed in blood cells and targets Bruton Tyrosine Kinase (BTK), an effector of the B cell receptor signaling [78]. When B cells have low levels of miR185, cells produce high titers of autoreactive antibodies and lead to autoimmune features in mice. Although our findings are in extracellular miRNAs, these three miRNAs have also been found in lower levels in MG PBMCs [24,25], where they can have a role in

Serum miRNA Profiles in Myasthenia Gravis Patients

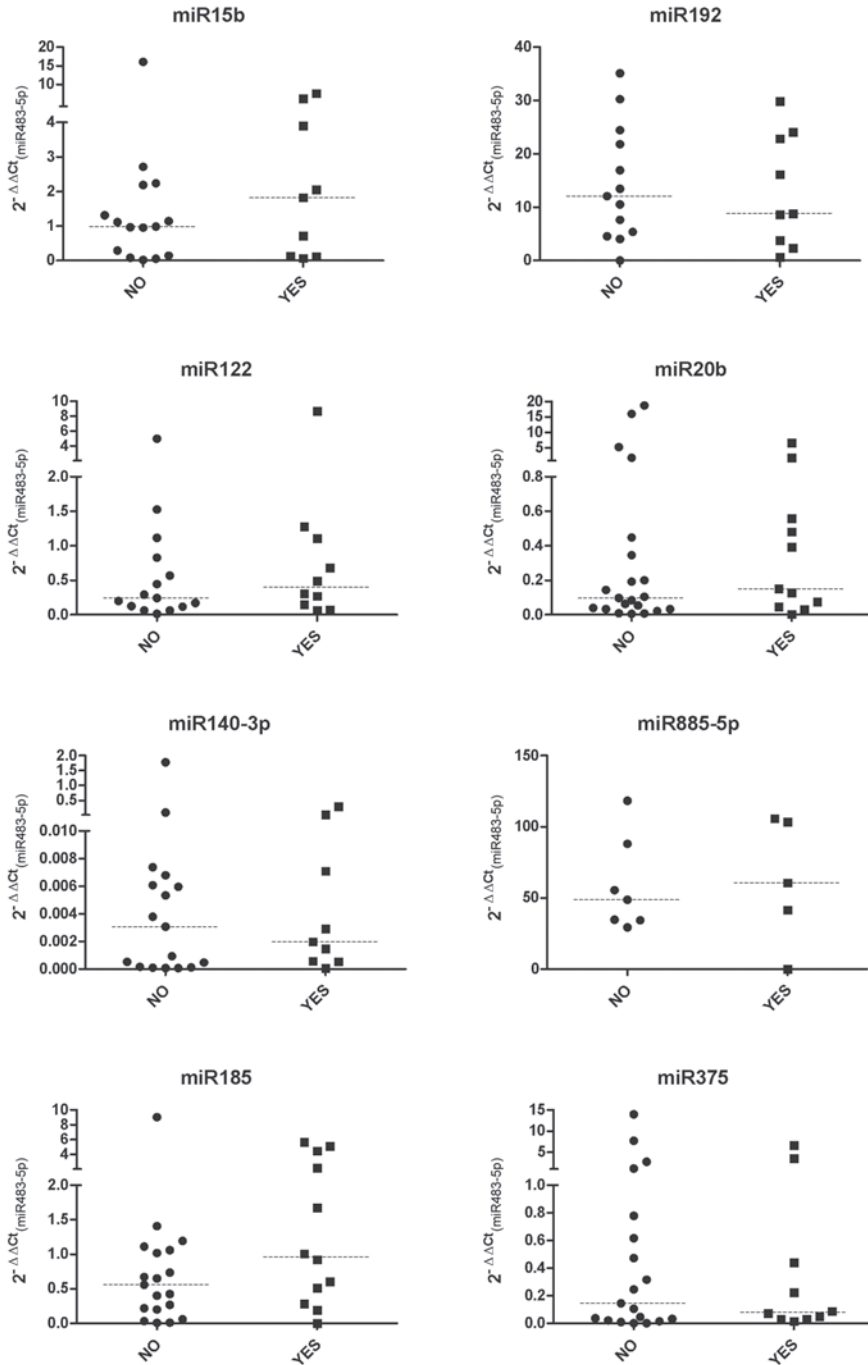


Figure 3. Effect of thymectomy on miRNAs levels in the validation cohort. YES = thymectomized MG patient; NO = not thymectomized MG patient.
doi:10.1371/journal.pone.0091927.g003

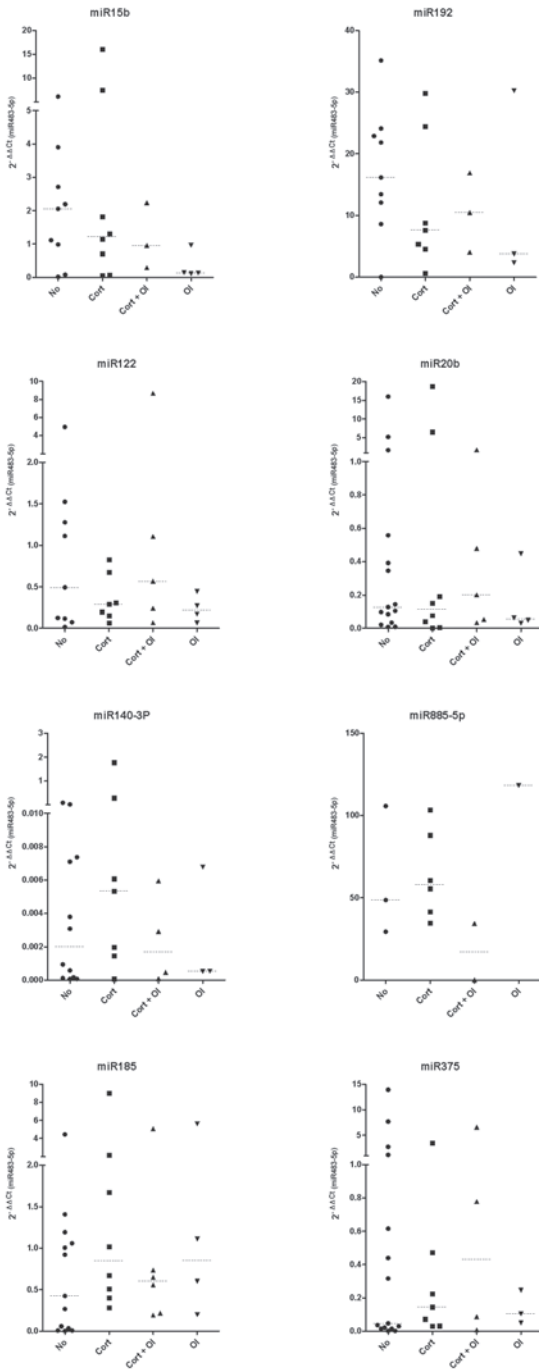


Figure 4. Effect of immunosuppressors treatment on miRNAs levels in the validation cohort. NO = non-treated; Cort = patient treated with steroids; Cort + OI = patient treated with steroids + other immunosuppressor agent; OI = patient treated with immunosuppressor agents other than steroids.

doi:10.1371/journal.pone.0091927.g004

MG pathogenesis by regulating key pathways in B cell survival and autoantibody production.

MiR-122 is highly expressed in liver [76] and has an important positive role in the regulation of hepatitis C virus replication [79]. Many studies propose miR-122 as a valuable circulating biomarker for diagnosis and prognosis of different liver diseases [80,81,82,83]. Although liver must be the main contributor to serum miR-122, other tissues expressing this miRNA (brain, heart, kidney, lung, ovary, testis and thymus) can also be participating [37]. In addition, in *in vitro* reporter assays [84], miR-122 regulates the nuclear factor of activated T cells calcium dependent (NFATC1) and neuronal cell adhesion molecule 1 (NCAM1). Both are molecules related with the immune system playing roles in proliferation of T and B cells after antigen stimulation [85], and regulation of natural killer cells and subpopulations of T cells [86,87]. Further studies are needed to understand the role of circulating miR-122 in MG.

Conclusions

In summary, we identified a set of 7 miRNAs that had lower levels in serum of MG patients. Our findings support that (1) EOMG and LOMG share a miRNA profile and therefore share common altered mechanisms; (2) the neoplastic process of a thymoma does not contribute to changes in the sera levels of the studied miRNAs; (3) MG treatment intervention does not modify this set of miRNAs; and (4) the analysis of circulating miRNAs might provide insights into the pathogenesis of MG since some of these miRNAs have also been found lower in peripheral mononuclear cells, and have targets with important roles in B cell survival and antibody production. Further studies in larger

cohorts of patients will be needed to determine whether these miRNAs could be useful biomarkers in clinical prognosis or response to therapy

Supporting Information

Table S1 Raw data for qPCR studies. This table is composed of three worksheets: Taqman array microfluidic cards Human MicroRNA Array A panel v2.0; individual analysis study 1; and individual analysis study 2. A = early onset MG; B = late onset MG; C = thymoma MG; E = healthy control; Ref sample = same sample to perform relative quantification for all the plates. (XLSX)

Table S2 Differential miRNA levels in the discovery cohort. miRNAs showing differences in a specific subgroup of MG are indicated in bold; Padj = P adjusted. (XLSX)

Acknowledgments

We thank Alex Sanchez and Ferran Briansó from the Unitat de Bioestadística i Informàtica of Vall d'Hebron Research Institute for their help in the statistical analysis, Almudena R. Ramiro for her insightful comments and Carolyn Newey for revising the English.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GNG ARF LQ EG II. Performed the experiments: GNG XSC MN. Analyzed the data: GNG ARF XSC JLM LQ EG II. Contributed reagents/materials/analysis tools: RRG JDM LQ II. Wrote the paper: GNG ARF XSC JLM LQ EG II.

References

- Vincent A, Palace J, Hilton-Jones D (2001) Myasthenia gravis. *Lancet* 357: 2122–2128.
- Drachman DB (1994) Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 330: 1797–1810.
- Querol L, Illa I (2013) Myasthenia gravis and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol* 26: 459–465.
- Patrick J, Lindstrom J (1973) Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 180: 871–872.
- Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ (2006) Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 116: 2843–2854.
- Yang B, McIntosh KR, Drachman DB (1998) How subtle differences in MHC class II affect the severity of experimental myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol* 86: 45–58.
- Deitiker PR, Oshima M, Smith RG, Mosier DR, Atassi MZ (2006) Subtle differences in HLA-DQ haplotype-associated presentation of AChR alpha-chain peptides may suffice to mediate myasthenia gravis. *Autoimmunity* 39: 277–288.
- Melms A, Luther C, Stoecle C, Poschel S, Schroth P, et al. (2006) Thymus and myasthenia gravis: antigen processing in the human thymus and the consequences for the generation of autoreactive T cells. *Acta Neurol Scand Suppl* 183: 12–13.
- Giraud M, Taubert R, Vandiedonck C, Ke X, Levi-Strauss M, et al. (2007) An IRF3-binding promoter variant and AIRE control CHRNA1 promiscuous expression in thymus. *Nature* 448: 934–937.
- Gertel-Lapter S, Mizrahi K, Berrih-Akmin S, Fuchs S, Souroujon MC (2013) Impairment of regulatory T cells in myasthenia gravis: studies in an experimental model. *Autoimmun Rev* 12: 894–903.
- Tackenberg B, Kruth J, Bartholomaeus JE, Schlegel K, Oertel WH, et al. (2007) Clonal expansions of CD4+ B helper T cells in autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol* 37: 849–863.
- Meriggioli MN, Sanders DB (2009) Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol* 8: 475–490.
- Farrugia ME, Vincent A (2010) Autoimmune mediated neuromuscular junction defects. *Curr Opin Neurol* 23: 489–495.
- Leite MI, Jones M, Strobel P, Marx A, Gold R, et al. (2007) Myasthenia gravis thymus: complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol* 171: 893–905.
- Cavalcante P, Bernasconi P, Mantegazza R (2012) Autoimmune mechanisms in myasthenia gravis. *Curr Opin Neurol* 25: 621–629.
- Ionita CM, Acasadi G (2013) Management of juvenile myasthenia gravis. *Pediatr Neurol* 48: 95–104.
- Sanders DB, Burns TM, Cutter GR, Massey JM, Juel VC, et al. (2013) Does change in AChR antibody level correlate with clinical change in MG? *Muscle Nerve*.
- Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I, Kiechl S, Mayr M (2012) Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res* 93: 555–562.
- Dimmeler S, Nicotera P (2013) MicroRNAs in age-related diseases. *EMBO Mol Med* 5: 180–190.
- Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T (2013) MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 774: 1–20.
- Fernandez-Hernando C, Ramirez CM, Goedecke L, Suarez Y (2013) MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 178–185.
- Khella HW, Bakhet M, Lichner Z, Romaschin AD, Jewett MA, et al. (2013) MicroRNAs in kidney disease: an emerging understanding. *Am J Kidney Dis* 61: 798–808.
- Pauley KM, Cha S, Chan EK (2009) MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 32: 189–194.
- Jiang L, Cheng Z, Qiu S, Que Z, Bao W, et al. (2012) Altered let-7 expression in Myasthenia gravis and let-7c mediated regulation of IL-10 by directly targeting IL-10 in Jurkat cells. *Int Immunopharmacol* 14: 217–223.
- Cheng Z, Qiu S, Jiang L, Zhang A, Bao W, et al. (2013) MiR-320a is downregulated in patients with myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *J Clin Immunol* 33: 567–576.
- Lu J, Yan M, Wang Y, Zhang J, Yang H, et al. (2013) Altered expression of miR-146a in myasthenia gravis. *Neurosci Lett*.

27. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, et al. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10513–10518.
28. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, et al. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18: 997–1006.
29. Toyama Y, Hur K, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, et al. (2013) Serum miR-200c Is a Novel Prognostic and Metastasis-Predictive Biomarker in Patients With Colorectal Cancer. *Ann Surg*.
30. Wang Z, Hong Z, Gao F, Feng W (2013) Upregulation of microRNA-375 is associated with poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biochem*.
31. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N (2011) Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 193–208.
32. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, et al. (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 285: 17442–17452.
33. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13: 423–433.
34. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19: 43–51.
35. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, et al. (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5003–5008.
36. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39: 7223–7233.
37. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engle PW, Vlasakova K, Muniappa N, et al. (2009) Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* 55: 1977–1983.
38. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, et al. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654–659.
39. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, et al. (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3: e3694.
40. Sangokoya C, LaMonte G, Chi JT (2010) Isolation and characterization of microRNAs of human mature erythrocytes. *Methods Mol Biol* 667: 193–203.
41. Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, Cazzella V, D'Amico A, et al. (2011) miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 3: 258–265.
42. Corsten MF, Demner R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, et al. (2010) Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3: 499–506.
43. Lewis AP, Jopling CL (2010) Regulation and biological function of the liver-specific miR-122. *Biochem Soc Trans* 38: 1553–1557.
44. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Falth M, Haese A, et al. (2011) Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 128: 608–616.
45. Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, et al. (2010) A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One* 5: e13735.
46. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, et al. (2010) Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 251: 499–505.
47. Mo MH, Chen L, Fu Y, Wang W, Fu SW (2012) Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *J Cancer* 3: 432–448.
48. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M (2007) Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol Lett* 113: 76–82.
49. Setzer F, Oberle V, Blass M, Moller E, Russwurm S, et al. (2006) Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocyte cells: a DNA microarray study. *Platelets* 17: 571–576.
50. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, et al. (2008) Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 3: e3148.
51. Xiao J, Shen B, Li J, Lv D, Zhao Y, et al. (2014) Serum microRNA-499 and microRNA-208a as biomarkers of acute myocardial infarction. *Int J Clin Exp Med* 7: 136–141.
52. Macha MA, Seshacharyulu P, Krishn SR, Pai P, Rachagani S, et al. (2014) MicroRNAs (miRNA) as Biomarker(s) for Prognosis and Diagnosis of Gastrointestinal (GI) Cancers. *Curr Pharm Des*.
53. Zheng H, Liu JY, Song FJ, Chen KX (2013) Advances in circulating microRNAs as diagnostic and prognostic markers for ovarian cancer. *Cancer Biol Med* 10: 123–130.
54. Chen W, Wang H, Chen H, Liu S, Lu H, et al. (2014) Clinical significance and detection of microRNA-21 in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma in Chinese Population. *Eur J Haematol*.
55. Tsai HL, Yang IP, Huang CW, Ma CJ, Kuo CH, et al. (2013) Clinical significance of microRNA-148a in patients with early relapse of stage II stage and III colorectal cancer after curative resection. *Transl Res* 162: 258–268.
56. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85.
57. Mestdagh P, Van Vlierbergh P, De Weer A, Muth D, Westermann F, et al. (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10: R64.
58. Dvinge H, Berton P (2009) HT-qPCR: high-throughput analysis and visualization of quantitative real-time PCR data in R. *Bioinformatics* 25: 3325–3326.
59. Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article3.
60. Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y (2003) Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* 19: 368–375.
61. Berrich-Aknin S, Le Panse R (2014) Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*.
62. Berrich-Aknin S, Ruhlmann N, Bismuth J, Cizeron-Clairac G, Zelman E, et al. (2009) CCL21 overexpressed on lymphatic vessels drives thymic hyperplasia in myasthenia. *Ann Neurol* 66: 521–531.
63. Eymard B, Berrich-Aknin S (1995) [Role of the thymus in the physiopathology of myasthenia]. *Rev Neurol (Paris)* 151: 6–15.
64. Thorlacius S, Aarli JA, Riise T, Matre R, Johnsen HJ (1989) Associated disorders in myasthenia gravis: autoimmune diseases and their relation to thymectomy. *Acta Neurol Scand* 80: 290–295.
65. Zivkovic SA, Clemens PR, Lacomis D (2012) Characteristics of late-onset myasthenia gravis. *J Neurol* 259: 2167–2171.
66. Aragonés JM, Bolibar I, Bonfill I, Buffill E, Mummanly A, et al. (2003) Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology* 60: 1024–1026.
67. Suzuki S, Utsugisawa K, Nagane Y, Satoh T, Kuwana M, et al. (2011) Clinical and immunological differences between early and late-onset myasthenia gravis in Japan. *J Neuroimmunol* 230: 148–152.
68. Csuka D, Banati M, Roza C, Fust G, Illes Z (2012) High anti-EBNA-1 IgG levels are associated with early-onset myasthenia gravis. *Eur J Neurol* 19: 842–846.
69. Stacy S, Williams EL, Standifer NE, Pasquali A, Krolick KA, et al. (2010) Maintenance of immune tolerance to a neo-self acetylcholine receptor antigen with aging: implications for late-onset autoimmunity. *J Immunol* 184: 6067–6075.
70. Rainer J, Ploner C, Jesacher S, Ploner A, Eduardoff M, et al. (2009) Glucocorticoid-regulated microRNAs and mitrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 23: 746–752.
71. Davis TE, Kis-Toth K, Szanto A, Tsokos GC (2013) Glucocorticoids Suppress T Cell Function by Up-Regulating MicroRNA-98. *Arthritis Rheum* 65: 1882–1890.
72. Liang H, Gong F, Zhang S, Zhang CY, Zen K, et al. (2013) The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdiscip Rev RNA*.
73. Leuenberger N, Robinson N, Saugy M (2013) Circulating miRNAs: a new generation of anti-doping biomarkers. *Anal Bioanal Chem* 405: 9617–9623.
74. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15524–15529.
75. Li G, Miskimen KL, Wang Z, Xie XY, Brenzovich J, et al. (2010) STAT5 requires the N-domain for suppression of miR15/16, induction of bcl-2, and survival signaling in myeloproliferative disease. *Blood* 115: 1416–1424.
76. Beveridge NJ, Tooney PA, Carroll AP, Tran N, Cairns MJ (2009) Down-regulation of miR-17 family expression in response to retinoic acid induced neuronal differentiation. *Cell Signal* 21: 1837–1845.
77. Shiono H, Fujii Y, Okumura M, Takeuchi Y, Inoue M, et al. (1997) Failure to down-regulate Bcl-2 protein in thymic germinal center B cells in myasthenia gravis. *Eur J Immunol* 27: 805–809.
78. Belver L, de Yébenes VG, Ramiro AR (2010) MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunology* 33: 713–722.
79. Jangra RK, Yi M, Lemon SM (2010) Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 84: 6615–6625.
80. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, et al. (2009) Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4402–4407.
81. Shifeng H, Danni W, Pu C, Ping Y, Ju C, et al. (2013) Circulating liver-specific miR-122 as a novel potential biomarker for diagnosis of cholestatic liver injury. *PLoS One* 8: e73133.
82. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, et al. (2010) Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* 56: 1830–1838.
83. Koberle V, Kronenberger B, Pleil T, Trojan J, Imelmann E, et al. (2013) Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 49: 3442–3449.
84. Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, Chau GY, Lin CW, et al. (2009) MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49: 1571–1582.
85. Hock M, Vaeth M, Rudolf R, Patra AK, Pham DA, et al. (2013) NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. *J Immunol* 190: 2345–2353.

Serum miRNA Profiles in Myasthenia Gravis Patients

86. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169: 2233–2238.
87. Almejadi M, Flanagan BF, Khan N, Alomar S, Christmas SE (2014) Increased numbers and functional activity of CD56+ T cells in healthy cytomegalovirus positive subjects. *Immunology*.

Tabla Suplementaria 1: Taqman array microfluidic cards Human MicroRNA Array A panel v2.0

A= early onset MG; *B*= late onset MG; *C*= thymoma MG; *E*=healthy control

	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	
hsa-let-7a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	3747	3267	40	3926	40	
hsa-let-7c	2936	2982	31.15	32.33	40	32.24	30.96	30.97	31.85	40	30.23	33.19	30.12	29.81	32.75	27.43	27.97	27.94	27.27	26.36	
hsa-let-7d	27.25	31.01	30.67	31.94	31.25	29.49	28.97	31.21	28.74	29.46	26.83	33.83	28.29	30.02	27.09	24.91	24.7	27.14	25.63	25.19	
hsa-let-7e	26.16	28.18	28.28	28.77	30.61	28.35	27.77	26.46	26.1	27.27	24.62	29.25	24.46	27.78	24.66	23.1	21.97	23.48	23.06	22.99	
hsa-let-7f	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	33.15	40	40	30.83	
hsa-let-7g	28.03	32.75	32.21	36.35	40	29.68	28.62	31.21	37.49	31.59	25.79	34.41	27.63	31.34	27.86	23.86	23.09	26.62	25.73	23.6	
hsa-miR-1	31.43	33.81	32.14	40	40	40	40	31.73	40	32.56	40	36.67	35.15	36.64	37.06	36.13	29.64	30.04	39.47	29.11	30.82
hsa-miR-9	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35.19	40	40	40	
hsa-miR-10a	29.39	40	30.53	40	40	31.05	32.29	40	30.93	40	31.33	32.54	28.99	30.51	29.16	27.39	29.08	30.4	28.95	29.33	
hsa-miR-10b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
U6 snRNA	23.01	20.4	20.01	23.7	22.97	26.07	24.97	22.22	20.19	23.93	19.59	23.4	22.62	22.71	20.96	21.66	20.12	19.42	18.72	17.92	
U6 snRNA	22.96	20.36	20.02	23.25	22.72	25.64	25	21.84	20.23	24.45	18.96	23.07	22.87	22.12	20.98	21.21	19.98	19	18.47	18.07	
hsa-miR-15a	40	36.25	40	40	40	40	40	40	40	40	38.43	37.53	40	40	38.7	30.08	30.19	32.99	38.42	31.19	
hsa-miR-15b	26.73	31.13	29.26	34.52	36.15	30.33	27.51	29.26	34.62	33.46	25.24	29.64	29.42	31.37	28.11	22.19	22.28	25.3	24.82	24.16	
hsa-miR-16	22.92	22.1	19.96	21.21	23.38	25.28	23.98	22.38	20.82	23.81	20.74	24.17	22.88	19.84	20.23	18.24	18.19	17.99	16.28	16.35	
hsa-miR-17	22.25	22.2	21.2	24.26	23.57	25.08	23.03	22.21	22.36	24.58	20.89	24.33	22.92	22.28	21.09	18.97	18.82	19.42	17.72	17.67	
hsa-miR-18a	40	40	38.47	40	40	38.83	40	40	40	31.43	33.99	40	37.22	40	34.13	27.26	27.04	31.96	28.22	27.52	
hsa-miR-18b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.03	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-19a	25.78	25.43	23.93	27.01	27.32	28.61	26.34	25.67	25.19	28.3	24.14	27.33	26.6	25.31	24.16	21.96	21.57	22.29	20.75	20.97	
hsa-miR-19b	22.55	22.17	20.31	23.08	23.67	25.18	23.43	22.24	21.77	24.76	20.72	23.97	22.91	22.14	20.97	18.36	18.34	18.58	17.32	17.72	
hsa-miR-20a	21.9	22.74	21.16	26.23	25.28	24.96	23.5	22.79	23.38	27	21.48	23.7	22.98	22.48	21.84	19.08	18.83	19.19	18.24	18.18	
hsa-miR-20b	26.3	27.2	24.94	27.48	29.35	28.67	28.26	26.79	26.82	30.06	25.47	30.19	26.67	26.39	25.32	23.21	22.86	23.19	21.47	21.36	
hsa-miR-21	23.27	25.75	25.07	28.37	28.42	26.96	26.91	25.29	26.22	30.56	23.6	24.71	25.47	25.57	24.17	21.13	21.95	22.68	22.55	22.79	
hsa-miR-22	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-23a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.46	37.93	40	35.94	34.76
hsa-miR-23b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-24	22.75	22.46	21.26	25.67	23.82	25.61	23.09	22.13	21.93	26.26	21.26	24.36	24.04	23.21	21.48	18.46	18.42	19.2	17.68	17.84	
hsa-miR-25	25.85	26.26	25.14	29.29	28.81	29.44	26.25	26.85	26.45	29.41	24.27	26.82	26.6	25.46	25.44	21.74	21.58	22.27	21.96	21.81	
hsa-miR-26a	23.51	25.18	24.49	29.05	26.87	26.56	24.75	25.54	25.55	27.55	22.54	25.25	24.88	26.02	23.32	20.62	20.14	22.71	22.02	20.8	
hsa-miR-26b	24.43	24.86	24.51	28.81	29.24	26.95	24.75	24.64	27.04	28.53	23	25.19	25.04	26.02	24.95	21.39	20.78	22.68	22.43	21.02	
hsa-miR-27a	25.82	27.27	26.3	30.54	28.69	29.11	28.16	27.52	27.98	40	24.98	27	28.51	27.56	26.75	22.54	22.74	24.24	24.22	24.22	
hsa-miR-27b	26.48	28.7	32.15	40	40	28.83	29.58	29.87	30.15	40	26.08	27.86	29.35	28.21	28.62	23.91	24.18	25.93	25.24	25.98	
hsa-miR-28-3p	30.24	28.1	27.49	34.04	29.78	32.49	32.29	29.02	28.09	30.53	28.51	31.44	28.39	28.07	27.54	26.68	26.12	26.61	24.74	24.36	
hsa-miR-28	27.47	30.76	28.42	40	30.03	32.68	29.42	28.87	32.47	40	26.78	29.23	29.58	33.07	27.34	24.92	24.19	26.53	26.19	25.13	
U6 snRNA	23.24	20.44	20.24	23.6	22.8	25.69	24.44	21.74	20.11	24.07	19.4	23.18	22.67	22.07	20.9	21.33	20.02	19.25	18.55	17.98	
U6 snRNA	23.37	20.39	20.13	23.48	22.88	25.65	24.5	21.76	19.86	24.22	19.58	22.77	22.65	22.32	21.11	21.6	20	19.32	18.54	17.89	
hsa-miR-29a	28.74	32.47	30.24	28.32	29.1	30.11	34.6	32.85	28.34	30.9	30.06	31.54	36.38	30.56	27.84	25.77	25.92	27.41	25.48	23.89	
hsa-miR-29b	33.12	40	40	40	40	35.23	34.38	40	40	40	33.19	40	31.46	40	40	32	36.65	39.86	34.82	30.68	
hsa-miR-29c	31.41	31.28	30.21	34.04	35.73	34.7	31.98	32.28	33.06	34.98	30.43	32.88	33.08	31.23	30.56	25.93	26.03	28.15	26.25	27.18	
hsa-miR-30b	23.41	25.05	24.09	26.7	26.1	26.41	24.07	23.89	24.59	25.93	22.25	25.14	24.35	24.9	22.97	20.79	20.59	22.16	21.69	21.15	
hsa-miR-30c	23.22	24.53	23.62	27.31	25.18	26.17	23.64	23.42	24.19	26.8	21.7	24.92	24.3	24.65	22.25	20.33	19.92	21.78	21.23	20.15	
hsa-miR-31	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35.24	33.05	39.11	40	40	
hsa-miR-32	40	40	36.93	32.46	34.19	40	33.31	32.51	40	40	40	40	40	31.74	40	40	27.3	30.38	30.43	31	34.66
hsa-miR-33b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-34a	27.38	25.44	25.02	26.9	27.85	40	27.99	25.79	26.85	29.11	26.49	28.01	26.19	27.69	25.72	24.07	25.17	25.14	25.23	26.27	
hsa-miR-34c	40	40	40	40	40	39.79	36.99	40	40	40	40	40	40	40	40	39.58	36.88	40	40	40	
hsa-miR-92a	21.33	22.57	20.18	23.18	25.71	25.44	23	22.78	22.79	24.99	20.38	22.6	22.49	21.58	22.58	19.43	19.72	19.78	19.29	19.6	
mmu-miR-93	26.49	26.5	25.25	27.94	32.42	28.52	27.79	26.98	26.93	30.94	24.72	30.2	26.71	26.19	25.87	22.22	22.07	22.09	21.18	21.29	
hsa-miR-95	30.49	31.49	33.86	40	40	35.45	32.98	35.45	40	40	31.31	32.66	32.56	40	33.66	30.06	29.59	30.84	29.07	28.17	
mmu-miR-96	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-98	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	32.95	39.92	40	40	
hsa-miR-99a	31.84	38.88	31.42	40	40	34.24	40	40	40	40	35.02	27.89	33.29	31.98	40	28.1	32.19	31.23	30.77	33.42	
hsa-miR-99b	28.12	29.5	28.24	40	33.91	34.3	29.49	31.8	30.49	40	27.02	32.44	30.62	31.81	28.43	25.5	25.43	27.83	26.22	26.37	
hsa-miR-100	31.92	31.97	30.05	40	40	33.46	35.77	40	40	40	34.9	25.77	32.83	33.28	40	27.42	29.89	32.61	29.58	28.87	
hsa-miR-101	27.66	29.3	26.45	40	40	30.89	28.07	32.6	29.63	40	26.45	28.96	29.7	28.73	28.32	25.45	26	27.42	26.31	25.68	
hsa-miR-103	30.33	40	36.51	40	40	37.04	30.91	33.05	37.17	33.16	29.52	40	34.64	40	33.21	25.4	24.55	28.67	28.08	26.19	
hsa-miR-105	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-106a	22.58	22.27	21.1	24.11	23.97	25.32	23.11	22	21.9	25.1	20.97	24.25	22.58	22.16	20.98	18.95	18.76	19.51	17.63	17.62	

	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	
RNU44	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35.75	40	40	40	36.59	
hsa-miR-106b	24.9	27	25.57	27.96	29.07	27.64	25.81	26.71	26.5	28.93	23.71	25.92	26.57	26.53	25.56	22.27	21.73	23.9	23.22	22.44	
hsa-miR-107	34.59	40	40	40	40	40	36.89	40	40	40	36.2	40	39.35	40	40	31.33	31.58	40	35.94	32.44	
hsa-miR-122	25.55	25.11	28.35	29.84	26.81	33.06	40	28.37	29.3	40	25.64	27.27	25.17	27.62	25.41	20.55	22.72	24.19	19.11	24.15	
mmu-miR-124a	39.78	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	37.43	40	40	40	
hsa-miR-125a-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	33.81	40	40	40	31.37	33.05	
hsa-miR-125a-5p	30.69	31.37	29.49	31.55	29.91	40	31.62	33.22	29.19	29.7	28.49	36.06	37.48	32.76	29.05	27.66	26.11	29.49	25.74	25.34	
hsa-miR-125b	29.46	30.93	33.09	40	40	33.17	33.11	30.28	31.54	40	29.02	30.28	31.1	30.14	40	25.62	26.4	29.42	25.92	27.48	
hsa-miR-126	21.67	21.03	20.08	22.35	22.04	24.22	22.39	21.03	20.45	22.94	20.32	22.39	21.81	20.53	19.35	18.36	18.51	19.36	17.61	17.36	
hsa-miR-127	33.83	27.92	30.9	40	40	30.96	31.65	33.08	31.97	40	28.22	29.38	37.9	36.13	30.33	24.91	24.19	27.73	26.65	26.17	
hsa-miR-127-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-128a	31.9	31.7	36.34	40	40	35.11	39.59	34.58	38.03	40	31.92	38.97	31.26	40	30.51	29.65	29.12	30.47	30.4	31.37	
mmu-miR-129-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-129	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-130a	27.06	29.82	28.52	31.4	33.3	30.36	29.36	28.84	29.95	40	26.02	29.61	27.83	28.61	29.3	23.22	23.59	24.93	23.69	25.45	
hsa-miR-130b	28.85	31.78	33.13	36.08	39.81	38.12	32.02	32.03	31.56	40	28.25	31.73	29.18	28.5	28.96	24.05	24.63	27.36	25.02	25.65	
hsa-miR-132	33.63	40	35.73	40	40	40	40	36.88	37.67	40	32.96	36.78	40	40	35.26	25.87	28.32	30.82	28.56	30.04	
hsa-miR-133a	33.7	40	32.06	34.28	35.59	40	32.47	32.89	27.42	31.54	33.45	30.98	33.19	32.13	30.67	26.51	26.65	28.71	24.31	26.04	
hsa-miR-133b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	34.5	37.46	35.7	31.57	35.52	
mmu-miR-134	40	34.34	34.8	34.59	40	40	40	37.71	31.48	40	38.73	40	35.27	40	32.82	31.83	31.23	30.6	27.26	27.5	
hsa-miR-135a	33.46	40	29.99	38.86	40	40	40	35.08	40	40	31.12	40	40	37.56	37.44	28.16	29.49	35.64	40	33.57	
hsa-miR-135b	40	40	34.87	30.34	40	33.77	35.97	40	40	40	40	40	40	40	32.85	36.67	33.63	35.32	40	32.8	39.65
hsa-miR-136	33.05	33.61	31.08	34.91	30.67	40	40	34.77	31.76	36.48	39.33	39.73	34.37	35.37	31.81	37.29	38.95	36.57	33.98	32.13	
mmu-miR-137	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-138	40	40	40	31.24	40	40	40	40	40	40	29.91	40	40	40	30.76	40	29.86	29.91	31.23	29.8	35.42
hsa-miR-139-3p	40	31.54	29.49	40	33.74	40	40	40	29.32	40	40	40	37.25	35.26	35.08	29.32	30.68	28.9	25.9	27.84	
hsa-miR-139-5p	26.5	24.83	24.12	27.19	26.36	29.84	29	25.43	25.63	28.37	25	26.96	26.22	25.16	23.91	22.84	22.98	23.22	22.1	22.09	
hsa-miR-140-3p	33.94	33.11	29.62	31.78	33.68	40	37.06	35.93	31.5	35.51	31.91	40	34.86	30.14	29.04	27.36	27.49	27.8	24.8	24.34	
mmu-miR-140	28.29	29.79	28.47	30.99	28.96	31.16	31.4	28.75	28.12	30.95	29.23	32.5	29.8	28.76	26.58	24.59	24.02	24.39	23.17	23.06	
hsa-miR-141	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	27.98	32.27	40	40	40	
hsa-miR-142-3p	22.25	24.53	25.12	26.38	27.59	25.18	23.47	24.28	24.1	25.02	21.74	23.64	23.19	24.64	23	19.77	19.59	21.35	21.66	21.36	
hsa-miR-142-5p	29.58	32.76	31.06	40	32.18	31.37	30.56	33.71	31.6	33.41	29.9	31.98	31.29	32.3	29.11	26.78	26.63	28	27.33	27.02	
hsa-miR-143	40	33.95	31.41	40	38.24	34.86	40	40	35.9	40	33.23	32.41	34.14	34.93	33.07	26.27	26.9	27.34	27.48	27.12	
hsa-miR-145	29.53	28.73	28.25	33.07	35.07	29.29	28.65	29.37	31.26	30.87	27.05	31.17	29.04	31.76	29.3	24.56	23.63	26.72	27.22	25.26	
hsa-miR-146a	22.96	23.42	21.5	23.93	22.59	26.77	26.05	22.05	21.88	25.19	22.79	26.85	24.15	23.61	20.84	19.85	20.87	20.61	17.98	18.69	
hsa-miR-146b-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	37.22	33.36	40	40	40	
hsa-miR-146b	27.55	26.89	26.09	27.25	27.53	29.85	28.7	26.6	26.07	28.13	25.89	29.37	26.83	26.92	25.01	23.61	23.5	24.6	22.75	22.46	
hsa-miR-147b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-148a	25.78	26.98	26.34	28.14	34.08	29.7	27.76	27.02	26.47	40	25	28.55	30.49	27.88	26.57	23.34	23.71	23.43	23.16	25.88	
hsa-miR-148b	29.03	31	30.12	34.17	40	32.84	30.38	30.59	32.29	34.36	27.85	32.74	31.43	36.25	31.18	26.18	26.92	27.77	27.57	29.78	
hsa-miR-149	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-150	22.55	21.73	20.86	23.08	22.37	26.7	24.94	22.6	21.15	24.28	21.94	22.8	21.62	21.21	20.02	20.21	19.56	20.31	19.65	18.12	
hsa-miR-152	26.76	27.26	27.01	30	29.06	30.35	29.97	26.53	29.39	40	26.23	27.81	27.56	28.26	27.06	23.75	24.61	26.02	24.49	26.2	
mmu-miR-153	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-154	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-181a	28.56	30.42	30.32	33.41	32.72	32.85	31.3	31.82	30.34	31.47	29.29	31.06	30.5	32.66	31.48	26.7	26.33	29.2	28.47	26.75	
hsa-miR-181c	32.87	36.59	35.16	38.69	38.84	40	40	40	36.72	38.83	40	39.32	37.95	40	40	31.67	32.28	33.65	32.59	31.12	
hsa-miR-182	33.72	40	35.21	40	40	40	35.91	34.81	40	33.98	35.33	37.79	40	40	30.93	36.1	34.6	35.24	32.6	32.02	
RNU48-001006	40	40	28.23	40	40	40	40	40	33.54	29.49	34.54	40	33.06	40	40	30.5	25.11	27.85	29.79	28.9	
hsa-miR-183	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-184	38.61	33.41	28.54	32.42	35.4	40	36.41	31.75	30.23	38.47	34.66	37.86	34.33	30.83	35.54	34.56	28.93	32.54	31.88	35.15	
hsa-miR-185	28.45	28.36	25.62	28.8	32.63	40	32.95	35.61	31.24	31.33	27.62	31.14	28.82	29	28.49	26.18	25.26	26.74	24.31	24.93	
hsa-miR-186	25.91	22.6	21.98	25.3	25.37	26.86	24.53	23.88	23.37	26.77	23.38	24.87	25.38	24.38	22.95	21.89	21.45	22.2	20.21	20.62	
mmu-miR-187	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-188-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-190	32.08	40	40	40	40	37.91	40	40	40	40	34.2	37.91	40	40	33.54	35.52	37	35.49	33.53	31.28	
hsa-miR-191	22.83	22.6	21.26	24	22.06	25.09	22.71	21.9	21.14	23.56	21.07	24.45	22.59	22.84	20.8	19.4	18.99	20.12	18.3	17.39	
hsa-miR-192	29.34	36.95	31.28	40	28.58	35.8	33.07	31.95	29.78	29.32	30.52	31.97	30.06	28.52	28.43	25.09	26.35	27.01	21.95	23.53	
hsa-miR-193a-3p	40	40	40	40	40	34.1	40	40	40	40	34.66	40	40	40	40	40	37.52	37.52	40	40	
hsa-miR-193a-5p	34.59	28.39	33.5	34.91	39.89	35.52	33.09	29.72	31.29	40	28	31.78	32.09	30.4	29.11	25.58	25.87	24.72	23.33	27.86	
hsa-miR-193b	32.05	30.19	31.6	33.87	33.13	40	40	34.5	32.74	40	32	30.8	30.78	30.31	40	27.11	28.96	30.41	23.17	27.53	
hsa-miR-194	25.57	22.19	22.43	23.78	25.62	29.9	23.74	22.63	22.24	26.64	22.35	23.9	23.16	22.22	23.48	22.57	21.7	23.37	22.43	23.13	

3 ■ TRABAJOS PUBLICADOS

	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5
hsa-miR-195	2564	2691	2426	2674	2739	2954	2786	269	2589	2863	25.18	27.15	27.89	25.58	25.37	22.53	22.67	22.85	21.38	21.24
hsa-miR-196b	3433	40	3878	40	40	35.32	40	40	40	40	39.12	40	40	37.69	32.86	33.04	33.16	36.97	32.15	30.31
hsa-miR-197	2705	2601	25.15	26.23	25.87	30.59	29.67	26.53	24.65	28.67	26.4	28.75	26.5	25.92	25.15	24.61	22.77	23.45	21.45	20.68
hsa-miR-198	40	40	40	40	40	40	40	39.75	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.61
hsa-miR-199a	32.19	40	40	40	40	40	40	40	40	40	30.84	40	40	40	32.35	29.53	29.02	32.46	40	30.41
hsa-miR-199a-3p	26.24	28.13	27.07	30.04	27.75	30.58	27.36	28.9	28.3	30.16	25.27	30.71	27.6	29.12	25.33	22.69	22.3	25.81	23.42	21.88
hsa-miR-199b	35.14	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35.35	34.19	30.33	32.37	40	31.71
hsa-miR-200a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.77	40
hsa-miR-200b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	28.28	32.99	40	29.05	34.25
hsa-miR-200c	40	38.45	34.91	34.38	40	40	40	32.86	36.26	40	40	40	40	40	36.12	31.18	30.74	33.72	31.17	27.96
hsa-miR-202	30.4	28.27	25.52	24.59	40	31.88	27.5	27.18	27.4	34.17	26.71	28.69	27.44	24.81	40	23.65	22.52	25.53	25.92	30.16
hsa-miR-203	35.41	31.36	27.46	40	40	40	40	24.8	34.6	40	27.1	31.09	31.61	29.92	38.53	24.98	24.85	24.43	24.37	29.58
hsa-miR-204	29.34	29.7	33.24	30.84	40	31.97	40	31.2	40	30.41	28.35	34.67	35.21	30.36	28.92	27.2	28.35	28.98	28.84	27.98
hsa-miR-205	30.89	29.81	28.52	30.4	31.48	40	30.3	29.82	30.07	32.07	30.06	34.94	33.61	30.45	29.95	27.21	28.08	32.27	30.81	27.26
hsa-miR-208b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.94	40	40	40
hsa-miR-210	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	34.01	40	36.28	26.18	29.9
hsa-miR-214	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	32.77	35.05	35.06	36.07	34.34
hsa-miR-215	40	40	37.57	40	40	40	40	40	40	37.81	40	40	38.23	35.37	39.92	26.58	27.58	31.06	28.73	28.6
hsa-miR-216a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-216b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	34.64	40	40	31.87	40
hsa-miR-217	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-218	40	29.98	30.3	31.46	34.25	29.96	28.07	29.69	29.8	40	27.35	35.33	29.83	29.96	31.61	26.49	23.59	27.83	27.49	31.43
hsa-miR-219	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-221	26.87	30.99	28.5	40	38.62	28.87	28.84	32.27	30.09	40	24.86	31.31	30.64	36.57	27.56	21.47	21.59	23.76	23.25	24.1
hsa-miR-222	24.99	23.81	21.74	22.68	23.03	27.51	25.43	23	21.67	23.28	23.23	25.97	23.62	21.82	21.42	20.35	20.45	19.84	18.74	19.07
hsa-miR-223	18.72	17.51	17.13	19.89	19.33	21.25	19.24	17.96	17.02	21.97	17	19.73	18.29	18.36	16.99	14.99	14.63	15.02	14.67	14.45
hsa-miR-224	34.04	40	34.86	40	40	33.97	40	35.31	32.73	40	28.2	32.35	36.31	40	40	26.8	26.12	31.11	25.43	32.52
hsa-miR-296-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.28
hsa-miR-296	29.51	40	34.6	40	40	35.85	31.56	33.27	40	33.43	32.77	40	34.38	37.68	32.86	29.05	28.69	30.09	30.24	29.09
hsa-miR-299-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-299-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-301	28.12	30.85	31.66	31.51	31.89	30.53	29.73	32.56	29.44	40	27.61	30.95	30.37	30.76	27.68	25.92	25.19	27.05	26.65	26.42
hsa-miR-301b	37.22	40	40	40	34.7	40	40	40	36.24	40	32.49	40	40	40	36.85	29.83	29.31	40	35.06	30.94
hsa-miR-302a	30.61	26.22	25.41	31.43	35.05	31.04	22.69	24.9	28.35	29.82	22.05	23.51	26.76	26.98	27.41	22.16	21.38	22.96	26.62	27.67
ath-miR159a	37.86	40	40	40	35.99	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.01	40	40	40
hsa-miR-302b	27.76	39.21	36.23	40	31.54	37.74	34.4	35.93	38.34	29.89	33.47	37.44	36.97	37.27	29.71	32.98	33.47	34.41	33.48	28.08
hsa-miR-302c	28.64	34.65	35.14	40	40	40	30.94	32.7	40	40	30.94	30.35	34.77	37.03	37.78	29.87	28.92	33.36	38.32	34.39
hsa-miR-320	23.36	22.94	19.88	22.37	23.09	26.25	22.99	21.84	21.9	22.69	21.55	24.54	22.6	21.16	21.19	21.34	22.38	20.53	18.83	19.43
hsa-miR-323-3p	30.85	36.02	35.42	40	40	32.84	31.6	34.42	40	40	32.09	34.55	35.18	35.81	34.65	31.16	30.74	31.29	32.2	30.92
hsa-miR-324-3p	36.15	33.29	30.9	32.67	33.98	34.15	31.58	37.35	34.5	40	30.13	33.9	32.98	39.25	30.17	27.21	27.17	28	26.97	26.86
hsa-miR-324-5p	34.32	40	40	40	40	35.93	31.79	40	40	40	28.07	40	40	40	35.05	26.3	26.21	27.84	26.75	26.98
hsa-miR-326	39.39	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.82	37.84	40	40	40
hsa-miR-328	24.53	24.97	22.97	28.89	27.17	27.93	24.99	24.97	25.23	28.59	22.43	25.25	25.47	26.43	24.87	21.38	21.29	23.2	21.96	22.41
hsa-miR-329	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.25	40	40	40	40	36.84	36.1	38.93	32.06	35.35
hsa-miR-330	35.21	40	35.73	40	40	40	40	39.79	36.62	40	34.69	40	35.57	35.87	31.63	30.82	30.12	31.02	29.39	29.56
hsa-miR-330-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-331	28.7	27.97	27.05	29.76	28.88	30.71	26.87	26.98	27.1	28.55	25.44	29.69	29.12	27.83	26.18	23.91	23.14	25.02	23.97	22.78
hsa-miR-331-5p	33.82	40	40	40	40	36.18	40	40	40	40	36.25	35.94	40	40	40	38.55	35.83	40	40	40
hsa-miR-335	25.92	28.02	26	28.58	28.97	29.56	26.6	26.88	27.85	28.95	24.96	27.66	28.27	27.28	25.75	23.6	23.29	24.69	24.01	24.97
hsa-miR-337-5p	34.29	40	40	40	38.77	40	40	40	40	40	38.35	38.13	40	40	40	36.01	40	40	40	31.77
hsa-miR-338-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	32.41	33.01	32.32	32.47	38.39
hsa-miR-339-3p	33.54	37.5	32.84	40	33.92	40	37.23	35.59	35.49	40	36	40	39.74	40	30.95	32.24	31.64	33.27	29.5	26.2
hsa-miR-339-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.59	34.12	40	40	40
hsa-miR-340	26.24	28.83	27.98	30.72	18.13	30.03	30.48	28.42	27.72	28.84	26.94	31.38	29.34	30.5	25.33	24.7	24.48	26	25.55	18.94
hsa-miR-155	25.31	22.69	22.68	23.62	24.73	30.68	25.3	24.48	22.86	24.7	25.6	26.7	24.2	23.64	23.02	24.65	23.87	23.58	22.72	22.19
hsa-let-7b	29.14	30.13	27.03	29.57	34.73	34.1	32.49	29.65	29.79	29.02	27.73	35.76	27.85	27.99	26.58	24.94	24.73	24.44	22.45	22.11
hsa-miR-342-3p	26.88	25.46	23.61	25.11	26.28	29.69	28.6	27.15	24.91	26.33	25.36	28.97	24.87	23.77	23.14	22.94	22.91	22.97	21.97	20.52
hsa-miR-342-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	37.15
hsa-miR-345	29.67	29.7	29.62	33.65	40	40	30.82	32.25	30.07	31.97	26.6	31.14	32.33	30.78	29.07	25.63	25.82	25.87	24.67	25.66
hsa-miR-361	36.61	36.84	40	40	40	40	40	33.46	40	40	40	40	40	35.56	40	34.36	28.04	31.04	28.9	28.98
hsa-miR-362-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	32.65	40	40	30.07	30.03	34.51	40
hsa-miR-362	32.44	40	40	40	40	35.41	34.63	34.59	40	40	30.74	34.56	40	31.94	32.92	31.75	29.18	33.19	29.39	29.22

	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5	
hsa-miR-363	28.69	18.28	17.52	17.33	40	22.42	21.01	18.96	18.4	40	19.21	25.4	18.82	17.24	28.03	20.25	19.75	17.66	17.68	28.65	
hsa-miR-365	33.53	40	40	40	37.2	40	40	40	40	38.32	40	40	40	40	31.97	34.92	39.94	39.74	31.43	28.69	
hsa-miR-367	27.72	30.68	32.97	34.39	27.95	40	30.18	31.43	32.08	29.06	32.65	30.58	33.51	33.08	34.35	30.73	33.84	31.68	32.09	30.67	
hsa-miR-369-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	33.04	30.58	40	40	40	
hsa-miR-369-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.68	40	40	36.36	
hsa-miR-370	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.49	34.08	38.08	35.23	31.24	
hsa-miR-371-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-372	37.95	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.94	40	40	40	40	38.32	37.75	39.12	40	40	
hsa-miR-373	40	40	40	40	40	33.22	35.64	40	40	40	34.09	35.65	39.17	40	40	33.46	33.7	33.01	40	40	
hsa-miR-374	24.54	22.15	21.43	21.9	24.8	27.25	23.22	22.16	21.64	25.76	22.43	24.32	22.72	21.72	23.36	21.18	20.75	21.79	20.98	21.6	
mmu-miR-374-5p	25.6	26.1	23.62	28.31	26.13	31.12	26.71	24.6	24	25.96	24.79	28.87	26.63	25.28	23.02	22.44	21.65	23.66	21.86	21.33	
hsa-miR-375	26.91	26.33	27.68	29.65	28.33	37.37	39.5	31.09	30.06	40	27.85	27.95	28.66	26.57	26.3	20.26	23.39	24.14	23.02	23.46	
hsa-miR-376a	30.38	30.69	28.89	35.9	29.53	31.2	29.32	27.93	29.26	29.12	27.57	28.56	31.94	29.81	27.02	25.87	24.78	26.91	25.1	24.86	
hsa-miR-376b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.23	
hsa-miR-377	38.36	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
mmu-miR-379	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	33.53	34.73	40	40	30.32	
hsa-miR-380-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-381	29.07	35.5	30.88	36.25	33.53	32.41	32.43	34.39	35.44	38.76	30.6	35.31	32.84	34.54	33.18	35.2	33.2	31.39	33.13	30.73	
hsa-miR-382	40	40	40	40	40	39.14	40	40	40	40	36.42	40	40	40	40	30.36	28.46	33.39	30.09	28.85	
hsa-miR-383	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-409-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.37	40	40	36.52	
hsa-miR-410	40	31.09	31.95	32.52	30.66	34.78	34.78	30.27	31.25	40	31.53	37.01	32.07	33.48	30.17	28.77	27.91	29.5	27.85	28.4	
hsa-miR-411	31.78	32.39	35.89	40	32.65	32.05	30.88	29.59	30.86	30.72	28.2	32.88	30.8	31.19	27.96	28.11	26.8	29.16	29.17	26.86	
hsa-miR-422a	31.3	29.95	29.22	32.95	35.47	40	37.16	31.19	32.02	40	30.27	40	40	30.65	33.87	28.94	29.75	28.01	27.46	30	
hsa-miR-423-5p	29.06	30.46	28.43	28.71	32.62	32.57	30.43	31.02	31.07	28.77	28.05	37.25	29.23	28.98	28.97	27.25	27.67	27.5	26.55	26.57	
hsa-miR-424	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.17	31.88	40	36.04	40	
hsa-miR-425-5p	30.64	27.84	27.93	28.17	29.15	33.35	34.91	29.48	27.4	31.05	29.21	39.25	32.08	27.38	25.96	25.18	24.9	24.63	23.07	22.35	
hsa-miR-429	33.96	40	32.72	40	40	40	40	33.07	38.37	40	40	37.24	40	40	40	29.24	31.42	35.59	29.65	30.7	
hsa-miR-431	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-433	40	34.77	40	40	40	40	40	40	40	40	37.7	40	40	40	40	32.87	30.92	32.58	30.2	30.41	
hsa-miR-449	40	40	32.25	40	40	40	40	40	40	40	35.07	40	40	40	40	38.29	40	40	34.8	40	
hsa-miR-449b	40	40	32.56	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	32.85	40	40	40	40	
hsa-miR-450a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35.12	40	40	39.04	40	
hsa-miR-450b-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-450b-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.21	32.25	40	40	32.41	
mmu-miR-451	20.68	22.23	20.62	23.87	25.86	25.42	24.05	24.65	23.71	27.4	20.16	21.6	24.62	22	23.43	18.45	18.61	19.77	18.94	18.28	
hsa-miR-452	40	40	40	40	40	37.38	40	32.49	36.24	40	36.42	36.95	40	31.07	34.98	35.65	34.96	31.74	28.56	40	
hsa-miR-453	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-454	25.33	24.61	23.06	24.1	22.38	30.49	25.92	23.84	23.65	24.79	25.35	25.68	24.2	23.76	22.75	24.72	23.49	24.08	22.08	22.51	
hsa-miR-455-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-455	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	33.52	40
hsa-miR-483-5p	24.23	22.84	22.59	23.82	24.91	29.57	24	23.46	23.2	25.81	22.92	24.09	23.43	23.37	22.2	22.73	23.02	22.16	20.39	22.17	
hsa-miR-484	21.9	21.86	18.77	22.08	22.88	26.72	25.33	22.16	20.63	23.72	20.76	27.77	23.6	21.33	20.44	20.78	20.34	19.84	17.41	17.69	
hsa-miR-485-3p	32.78	31.37	33.32	40	37.38	37.65	38.21	32.68	32.93	38.16	32.33	34	38.98	33.46	30.92	30.49	28.92	31.85	29.28	27.77	
hsa-miR-485-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-486-3p	39.12	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.86	40	40	40	40	40	39.08	40	36.21	37.52	
hsa-miR-486	29.27	31.02	25.27	28.12	35.2	38.19	38.96	37.94	29.19	32.05	27.06	36.45	34.57	26.69	28.94	27.27	26.52	26.64	24.4	23.65	
hsa-miR-487a	39.81	40	40	40	40	40	40	40	37.54	40	36.15	36.04	40	40	40	38.07	38.21	40	40	33.94	
hsa-miR-487b	36.45	35.75	33.68	40	40	40	40	35.66	40	40	33.8	39.22	36.55	34.38	29.55	31.93	29.67	31.69	29.28	26.85	
hsa-miR-488	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-489	40	36.15	33.09	39.12	40	36.38	40	40	40	40	40	35.66	33.36	40	40	32.51	31.91	35.2	32.13	40	
hsa-miR-490	40	39.5	40	36.61	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
hsa-miR-491-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
mmu-miR-491	27.75	29.52	27.62	29.85	28.32	35.17	29.76	26.88	28.58	26.13	28.66	32.25	30.61	29.11	25.22	26.98	26.09	26.9	26.33	25.27	
hsa-miR-493	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.2	40	40	40	38.27	40	32.83	40	
hsa-miR-494	31.47	40	34.5	40	40	40	37.85	40	32.1	30.15	32.15	37.08	33.67	36.15	31.47	29.68	28.41	30.31	29.88	28.68	
mmu-miR-495	38.52	40	35.33	36.22	34.96	36.76	40	39.39	40	28.22	35	40	40	39.49	32.89	30.2	29.41	33.06	29.55	27.73	
mmu-miR-496	40	40	40	40	40	36.3	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.71	34.67	40	40	40	
hsa-miR-499-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
mmu-miR-499	31.98	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.52	38.48	38.31	40	40	40	
hsa-miR-500	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.14	34.97	
hsa-miR-501-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.26	40	40	40	

3 ■ TRABAJOS PUBLICADOS

	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5
hsa-miR-501	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-502-3p	34.12	40	32.52	40	40	40	40	35.61	40	40	40	36.44	33.53	38.26	37.26	31.31	31.94	31.57	30.3	31.41
hsa-miR-502	37.83	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	33.48	40	40	32.83	40	40	40	40
hsa-miR-503	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-504	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-505	38.42	40	40	40	39.52	40	40	40	40	40	35.13	40	36.58	40	40	29.63	34.62	38.72	35.61	36.67
hsa-miR-507	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-508	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-508-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-509-5p	33.99	40	40	40	40	38.2	38.9	40	40	38.98	35.15	35.48	40	40	40	35.98	38.56	40	40	40
hsa-miR-510	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-512-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	33.43	38.75	40	40	40	35.51	40	40	39.25	40	40
hsa-miR-512-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-513-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-515-3p	40	33.62	39.85	36.52	40	40	40	38.75	40	36.62	37.84	40	40	40	34.16	40	37.62	35.5	36.8	36.08
hsa-miR-515-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	37.63	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-516a-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-516b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-517a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35.41	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-517c	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.95	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-518a-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-518a-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-518b	31.49	32.25	32.64	38.52	35.15	40	31.39	29.83	33.72	31.66	33.69	40	34.67	34.76	30.6	33.7	30.88	31.62	30.72	30.42
hsa-miR-518c	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-518d	30.92	31.24	30.69	30.53	30.33	32.81	34.84	32.38	30.65	29.96	33.45	34.65	32.57	29.98	28.79	31.39	34.51	31.63	31.29	29.05
hsa-miR-518d-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-518e	36.37	35.91	40	38.62	37.75	39.97	38.72	34.56	40	33.93	35.51	40	40	40	35.07	32.33	40	35.98	39.16	40
hsa-miR-518f	21.27	22.74	22.58	22.73	20.34	37.65	24.93	22.2	22.23	21.77	26.49	25.21	23.45	22.74	18.28	25.31	23.41	23.17	22.86	18.45
hsa-miR-519a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-519d	40	40	40	34.58	40	35	39.89	32.89	37.01	33.41	40	40	40	38.89	40	36.79	40	39.6	35.57	40
hsa-miR-519e	39.42	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-520a	31.54	40	40	40	40	40	40	40	40	29.85	40	40	40	40	31.61	40	40	40	40	29.29
hsa-miR-520a#	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-520d-5p	29.5	27.1	26.98	27.51	27.02	31.2	27.79	27.71	27.1	28.02	29.5	28.89	29.05	27.54	27.25	28.46	28.69	28.44	27.13	27.26
hsa-miR-520g	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	37.97	40	40	40	40
hsa-miR-521	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.93	40	40	40	39.62
hsa-miR-522	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-523	25.2	23.91	23.73	24.68	21.84	28.86	24.65	24.03	23.87	23.95	24.3	25.39	25.21	24.02	22.84	24.41	23.75	23.89	24.03	24.84
hsa-miR-524-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-525-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-525	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-526b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-532-3p	30.52	34.32	31.61	40	40	37.65	34.39	37.54	30.81	40	29.94	37.4	35.9	36.15	29.58	28.53	28.86	30.34	28.71	26.89
hsa-miR-532	34.76	40	31.36	40	40	40	40	36.45	40	40	32.26	40	40	40	37.81	26.6	27.25	28.58	26.43	27.21
hsa-miR-539	32.37	32.99	34.76	40	29.98	33.2	40	31.46	38.03	30.73	29.37	40	31.19	34.29	29.68	27.2	26.29	28.39	27.05	25.27
hsa-miR-541	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-542-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	29.88	40	40	40	40	31	31.23	30.79	40	40
hsa-miR-542-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-544	40	40	38.94	40	32.92	40	40	40	39	33.6	40	40	40	39.33	34.6	40	40	40	35.54	34.68
hsa-miR-545	32.66	40	38.19	40	40	35.1	36.7	36.08	39.7	40	30.44	36.39	40	36.59	34.01	30.1	30.1	32	29.89	30.17
hsa-miR-548a	28.39	29.7	29.47	30.17	29.03	31.49	30.07	29.49	29.84	28.36	29.63	29.54	30.11	30.19	28.22	29.11	29.75	29.87	29.81	28.08
hsa-miR-548a-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-548b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-548b-5p	35.03	34.89	40	34.57	40	40	40	37.47	40	40	31.45	34.38	40	40	37.47	40	40	36.77	40	40
hsa-miR-548c	29.96	29.3	29.25	30.66	28.55	32.14	29.85	28.97	30.86	29.96	29.03	29.83	29.46	29.7	28.75	30	30.58	29.52	28.94	28.57
hsa-miR-548c-5p	31.81	40	40	31.38	40	34.47	40	40	40	40	30.97	31.54	40	34.2	30.95	31.71	32.25	33.29	33.27	40
hsa-miR-548d	40	40	37.15	40	40	35.56	40	35.82	32.53	40	33.54	36.96	40	36.55	40	35.29	40	34.65	32.03	36.23
hsa-miR-548d-5p	31.22	40	40	35.89	40	40	40	40	40	40	32.02	33.93	40	39.42	30.35	36.56	36.45	40	39.46	35.84
hsa-miR-551b	30.42	37.51	40	40	40	40	32.14	39.86	40	40	33.51	34.39	36.94	40	40	35.14	34.96	36.68	40	36.84
hsa-miR-556-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-556-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-561	39.5	40	40	40	40	40	40	40	40	38.65	39.77	40	40	40	40	40	40	39.17	40	40

	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5
hsa-miR-570	40	39.01	40	40	40	40	37.96	34.79	37.53	40	40	33.73	40	40	40	36.2	40	40	39.25	40
hsa-miR-574-3p	28.09	27.26	25.69	29.53	27.77	29.69	29.28	27.52	25.86	29.59	25.78	29.9	27.81	26.62	25.81	24.31	24.38	25.33	21.99	22.46
hsa-miR-576-3p	34.06	33.71	30.36	40	40	35.44	40	31.68	40	40	31.13	32.31	40	40	40	30.13	29.51	29.64	32.12	29.79
hsa-miR-576-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	32.22	40
hsa-miR-579	40	40	40	40	40	40	40	36.78	40	40	34.81	40	40	40	40	31.82	31.38	30.08	33.13	35.72
hsa-miR-582-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	37.39	40	40	40	40	40
hsa-miR-582-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.55	40	40	40	40	40
hsa-miR-589	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	36.79	40	39.24	40	37.49
hsa-miR-590-5p	26.83	26.28	24.83	27.96	28.4	29.95	27.43	26.42	25.69	38.24	25.15	27.57	28.17	26.17	24.87	23.1	23.12	23.29	22.11	22.52
hsa-miR-597	25.09	29.58	34.75	31.27	40	28.15	25.91	28.73	36.75	40	25.97	26.09	28.27	30.82	28.43	24.95	25.99	28.14	33.35	28.35
hsa-miR-598	35.97	40	32.2	30.9	32.6	36.16	40	33.15	40	40	30.5	40	32.32	34.53	31.3	27.46	27.96	29.41	27.26	27.92
mmu-miR-615	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.52	40	40	40	40	40	40	37.14	40	40
hsa-miR-615-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-616	40	40	40	40	40	40	40	40	34.35	40	40	40	40	40	40	40	40	39.82	40	36.72
hsa-miR-618	23.73	25.7	25.63	26	24.49	33.68	26.02	25.08	24.81	24.12	26.28	25.77	25.37	25.5	24.81	25.59	24.69	25.12	25.21	22.74
hsa-miR-624	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-625	39.9	34.31	34.21	40	40	34.68	35.09	33.69	34.8	40	32.58	37.85	34.54	34.11	38.5	31.08	30.77	31.27	30.03	33.72
hsa-miR-627	23.45	36.23	34.08	37.3	32.82	40	37.55	32.93	33.28	30.1	33.1	34.51	38.15	37.81	28.79	32.74	29.06	31.18	32.82	26.68
hsa-miR-628-5p	21.85	23.03	22.96	23.23	21.74	40	25.39	22.6	22.44	22.48	26.83	27.03	23.5	23.57	20.53	25.76	24.63	23.47	23.05	20.5
hsa-miR-629	36.68	36.06	36.68	32.51	40	36.75	39.26	35.46	34.75	40	32.09	40	34.35	33.32	32.36	32.84	34.76	30.6	30.21	40
hsa-miR-636	27.82	33.35	29.55	35.53	31.11	31.83	31.24	31.23	34.72	33.37	29.97	31.38	32.23	32.88	30.41	31.13	30.49	30.28	28.43	27.54
hsa-miR-642	40	40	40	40	40	40	40	31.71	40	40	40	40	40	40	31.46	40	29.97	29.27	30.85	29.88
hsa-miR-651	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	32.46	40	40	40
hsa-miR-652	29.58	32.86	32.06	40	39.66	36.12	32.38	32.1	36.35	36.28	28.76	37.78	33.67	35.67	29.32	26.85	25.99	29.09	28.07	27.51
hsa-miR-653	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-654-3p	40	40	40	40	40	40	40	36.02	40	40	35.79	40	40	40	40	31.74	32.16	40	34.45	40
hsa-miR-654	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-655	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	32.39	33.74	36.11	36.64	32.35
hsa-miR-660	33.43	40	32.17	40	40	37.69	40	35.66	37.14	40	29.25	36.04	40	36.96	32.58	24.89	26.72	27.73	26.58	27.03
hsa-miR-671-3p	40	40	32.55	40	40	40	35.27	40	39.8	34.27	31.63	32.73	40	40	30.47	29.6	28.13	29.42	29.6	28.91
hsa-miR-672	34.71	40	32.66	40	39.89	40	35.33	33.92	40	40	40	35.21	40	40	40	40	38.5	39.87	35.63	37.08
hsa-miR-674	40	40	40	40	34.72	40	40	40	40	40	36.31	40	40	40	29.84	40	40	40	40	38.47
hsa-miR-708	29.24	32.43	32.72	33.55	38.33	30.67	29.63	29.57	29.51	40	29.51	28.25	32.09	31.26	31.76	28.76	30	29.28	30.68	30.94
hsa-miR-744	29.78	40	28.68	40	40	32.36	31.2	31.45	33.57	29.92	26.47	30.97	30.19	40	28.62	25.37	24.73	26.85	25.59	24.22
hsa-miR-758	38.46	40	40	40	40	37.87	37.48	40	40	40	34.97	40	36.72	40	40	33.14	38.64	35.41	34.08	40
hsa-miR-871	36.51	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.24	40	40	40	40	40
hsa-miR-872	37.01	40	39.8	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.55	39.3	40	40	40	40
hsa-miR-873	34.22	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.9	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-874	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-875-3p	40	40	40	40	40	40	39.18	40	40	40	40	40	38.41	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-876-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-876-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-885-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	35.16	40	40	40	40	37.32	40	40	38.9	40
hsa-miR-885-5p	31.83	29.02	34.21	27.28	27.94	35.86	37.36	31.12	27.34	40	27.29	31.61	27.45	27.08	24.42	22.8	25.22	24.21	20.08	24.68
hsa-miR-886-3p	31.18	31.71	30.49	30.97	40	37.13	38.62	40	37.53	40	36.18	30.77	31	40	32.79	40	40	34.12	31.14	31.92
hsa-miR-886-5p	34.5	34.06	34.67	32.34	40	39.1	40	40	34.75	40	31.52	31.81	31.35	40	35.53	31	32.17	31.67	28.36	30.36
hsa-miR-887	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-888	24	34.51	40	40	38.01	40	40	34.93	40	39.89	40	40	40	40	30.58	33.65	40	35	34.02	28.3
hsa-miR-889	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	34.39	32.69	40	32.02	32.51
hsa-miR-890	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-891a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-891b	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-892a	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-147	40	40	40	40	40	40	33.74	40	40	40	35.67	35.39	40	40	35.67	40	40	40	40	40
hsa-miR-208	27.78	39.38	33.96	40	30.51	40	38.91	30.89	40	29.91	35.03	40	36.88	31.07	33.65	29.84	40	31.1	33.15	29.33
hsa-miR-211	40	40	40	39.56	40	40	40	40	40	40	36.84	40	40	40	40	36.99	29.95	37.55	40	31
hsa-miR-212	31.35	37.29	33.3	40	33.02	32.34	27.3	31.96	40	40	25.81	32.29	37.64	35.24	30.04	25.72	27.19	29	29.48	29.27
hsa-miR-219-1-3p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	34.54	40	40	40	40	33.26
hsa-miR-219-2-3p	38.47	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-220	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	37.22	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-220b	40	40	40	40	40	39.43	36.39	40	40	40	35.31	40	36.23	40	40	39.94	36	36.88	40	40
hsa-miR-220c	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40

3 ■ TRABAJOS PUBLICADOS

	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5	E1	E2	E3	E4	E5
hsa-miR-298	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-325	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-346	35.95	40	40	40	40	40	40	37.68	40	40	40	40	40	40	40	38.46	39.75	34.58	40	39.41
hsa-miR-376	29.13	28.57	28.78	31.55	28.8	30.86	31.01	28.72	28.54	32.92	26.21	30.19	29.27	30.26	27.28	25.55	24.48	26.38	24.78	24.31
hsa-miR-384	38.52	40	40	40	40	37.93	40	37.59	40	40	40	36.47	40	40	37.72	40	36.88	40	40	40
hsa-miR-412	40	40	40	40	40	40	40	40	40	38.52	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-448	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-492	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-506	40	40	40	40	40	39.6	40	40	40	38.01	40	40	40	40	40	35.34	40	40	40	40
hsa-miR-509-3-5p	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-511	31.48	40	30.68	40	40	40	40	31.89	40	40	30.65	40	40	32.01	36.84	29.13	29.47	29.23	28.84	29.71
hsa-miR-517b	31.6	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	37.65	40	40	40	40	40	40	40	40
hsa-miR-519c	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.5	40
hsa-miR-520b	36.39	40	40	40	38.34	40	39.33	37.12	37.4	40	38.05	36.3	39.11	40	37.14	40	38.09	36.54	40	39.23
hsa-miR-520e	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	39.1	34.77	39.39	40	40
hsa-miR-520f	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40

Tabla Suplementaria 3: Individual analysis study. **A**= early onset MG; **B** = late onset MG; **C**= thymoma MG; **E**=healthy control; **Ref sample**= same sample to perform relative quantification for all the plates

	miR-483-5p	miR-185	miR-15b	miR-192	miR885-5p
A6	24.402382	40	40	40	40
A7	26.4011705	27.0231855	25.2388845	23.0081715	40
A8	26.4420605	26.561997	25.402435	23.3367545	40
A9	26.004387	25.262663	26.5039415	22.8650455	19.311204
A10	27.652003	26.559165	24.7479685	23.040513	40
A11	26.364794	24.2110255	23.7563885	22.350355	19.640221
A12	20.1850315	28.8957995	40	40	40
A13	20.654381	27.6165335	40	40	40
A14	21.107776	40	40	40	40
A15	27.8287585	28.560781	30.734308	25.909271	40
A16	21.2989885	40	40	40	40
A17	27.697032	40	26.5647285	40	40
A18	26.061097	27.899561	30.0609435	40	20.688738
A19	28.054652	28.027495	32.305813	40	40
A20	17.575613	40	40	40	40
A21	26.361603	23.866085	29.5110225	25.1356735	40
A22	25.9518575	27.2714605	25.5636565	23.527429	19.9417945
B6	26.173846	27.4124345	32.025025	21.583622	40
B7	28.032316	27.8792055	30.8526525	40	40
B8	27.0445065	28.950479	26.887371	21.9106195	40
B9	24.9723695	24.8902575	24.99462	21.375931	20.0961765
B10	20.760645	40	40	28.283867	40
B11	27.4537545	40	31.1452865	23.0065615	40
B12	25.5764395	26.154011	25.3851915	23.385558	19.78272
B13	27.320568	29.6505335	27.3723755	22.4019525	20.433839
B14	27.1114185	27.5543255	27.17552	23.029859	40
B15	25.2615	27.4665375	27.031655	23.240675	20.1584795
B16	24.987934	21.813012	20.983009	22.058798	19.871686
B17	22.163987	40	40	40	40
B18	23.1577895	27.286434	40	40	40
B19	20.821907	27.896784	40	40	40
B20	24.9439555	40	40	40	40
B21	23.0559325	27.959541	40	40	40
B22	19.208188	40	40	40	40
B23	18.102747	40	40	40	40
B24	19.628646	40	40	40	40
B25	27.632789	28.4742315	40	40	40
B26	28.503068	40	40	40	40
B27	27.926891	27.434026	40	40	40
C6	25.684143	28.0597545	40	40	40
C7	25.814396	25.560577	24.3738675	22.0665625	20.2107375
C8	26.851401	26.8413085	24.8855845	22.336321	40
C9	27.3822345	28.353613	26.513859	22.484275	21.4619535
C10	27.0663575	24.7182805	40	40	40
C11	27.088298	40	40	27.749067	40
C12	18.762418	40	40	40	22.7364645
E6	26.489317	40	40	40	40
E7	29.2961525	25.49379	23.970974	23.44456	22.0390645
E8	27.3310005	25.461834	24.5952825	22.9110095	25.2804125
E9	27.8157575	26.0502395	24.123942	23.2261705	21.6937635
E10	26.940443	23.091752	23.57134	22.1227175	19.1832625
E11	27.94472	26.02539	24.2477455	22.3207435	21.330701
E12	23.57992	40	40	40	40
E13	26.339364	27.967714	40	40	40
E14	23.161595	40	40	40	40
E15	24.0091485	27.6015895	40	40	40
E16	26.830003	24.7502035	22.637322	22.3145605	18.1231365
E17	26.5882415	24.03617	21.9744415	22.2578945	18.987274
E18	25.6338405	26.7832775	23.6729985	22.6529635	20.2154235
E19	27.8649	23.3829105	23.189687	22.128892	20.370733
E20	26.643097	23.982607	22.0027075	22.297889	19.677869
E21	27.8477725	25.6023065	23.718075	22.1689975	21.2093745
E22	27.659032	26.145865	23.5160035	22.7520655	20.9385475
Ref sample	25.062546	24.477055	22.493486	21.763607	21.019773

Tabla Suplementaria 4: Individual analysis study 2. **A**=early onset MG; **B**=late onset MG; **C**=thymoma MG; **E**=healthy control; **Ref sample**= same sample to perform relative quantification for all the plates

	miR483-5p	miR140-3P	miR-20b	miR-375	miR-122
A6	40	40	21,5285835	28,087185	40
A7	21,6011775	28,9928215	23,91755	21,9626405	23,6424635
A8	22,4496605	29,5871535	23,802208	27,5294645	23,469539
A9	20,7937265	29,778958	23,520085	22,9605745	21,354741
A10	40	29,6407805	23,736227	26,400854	23,041114
A11	20,7882545	26,822384	21,6298115	21,975088	20,4353025
A12	40	30,2706175	21,278186	24,7477475	40
A13	40	31,293646	22,794071	24,827163	40
A14	40	33,319565	20,587646	27,2271315	40
A15	21,162893	40	26,103439	25,496356	22,9492845
A16	40	30,884308	24,7006255	25,904569	40
A17	29,132004	32,6402025	26,746971	25,329629	40
A18	18,476093	32,176157	27,0537515	23,5422135	21,2227125
A19	20,686398	40	28,1175575	25,67548	24,687123
A20	40	40	40	40	40
A21	20,9398015	31,8162185	25,3236845	40	24,9307835
A22	20,274575	27,8252705	24,925771	40	22,046757
B6	20,7115915	33,693947	24,2906015	21,410606	23,727565
B7	24,329485	31,532984	25,489955	26,3544525	25,497179
B8	22,014748	40	25,3784025	26,800104	25,1154095
B9	19,9782265	28,021208	23,2366325	24,421186	19,8246875
B10	23,1372575	31,482064	25,933653	22,929021	22,529176
B11	20,250476	34,1321925	27,0829405	29,9321775	26,3042125
B12	20,880277	28,2447045	23,261074	23,6679745	21,154877
B13	20,9389225	31,843683	24,920755	24,1927455	23,475976
B14	21,410269	32,4824925	25,6233615	40	25,320464
B15	20,4974605	33,931725	25,411717	27,465478	21,3136835
B16	22,847869	22,0208815	18,622856	23,9313815	25,1786035
B17	40	40	27,356663	40	40
B18	18,810104	28,8725855	23,692978	24,3698265	40
B19	40	32,4718025	24,913307	26,7188035	40
B20	29,403088	40	25,405065	26,454339	40
B21	19,5378905	32,114204	25,107723	29,689203	40
B22	40	40	27,55225	27,8483375	40
B23	27,4231995	40	26,63462	25,9652235	40
B24	40	40	26,1251075	28,71642	40
B25	40	31,525588	26,661096	40	40
B26	40	40	40	40	40
B27	19,464832	33,388382	26,441017	25,5257985	40
C6	28,1136475	40	27,2249335	25,490424	24,9642515
C7	20,98774	28,0730235	22,521678	22,64881	18,677044
C8	20,9289285	31,695735	23,9099465	26,9631165	24,723194
C9	20,915644	30,334715	24,6309985	24,7061385	22,618906
C10	23,6235755	32,047322	24,682719	27,152836	23,4778165
C11	29,663116	31,467556	26,946547	27,8611025	40
C12	40	28,9189315	24,521286	26,408988	40
E6	22,720986	40	26,7206275	40	40
E7	22,403742	27,6762105	21,7729655	22,0198495	21,986397
E8	21,009847	28,2690575	21,653549	22,8667945	20,387439
E9	21,556416	27,520773	21,705822	21,5724155	19,9154255
E10	21,3741695	24,3625795	19,17315	23,033964	18,471592
E11	22,2278325	28,109074	22,2328755	22,3793725	20,6410285
E12	27,3536415	33,45143	25,759841	23,341842	40
E13	40	40	25,419751	25,9164085	40
E14	40	33,6198415	27,0696295	26,926091	40
E15	18,806364	31,1298025	24,3638715	26,1816835	40
E16	21,995117	27,482785	21,709274	21,7018335	19,8262655
E17	22,922964	24,858927	20,4981155	28,349146	21,1168145
E18	22,2777775	28,326235	22,267399	40	21,7220715
E19	21,763231	25,3960095	19,848809	40	18,9004345
E20	22,673401	25,9428435	20,613941	40	19,8026465
E21	21,410426	28,087715	21,2651875	21,6027495	20,989351
E22	21,8576145	26,544628	22,5257665	21,698474	20,851762
Ref sample	20,727848	25,5018955	20,480787	17,58323	17,6876605

ARTÍCULO 2

Myasthenia gravis: descriptive analysis of life-threatening events in a recent nationwide registry

Ramos-Fransi A, Rojas-García R, Segovia S, Márquez-Infante C, Pardo J, Coll-CantíJ, Jericó I, Illa I and Myasthenia NMD-ES Study Group

European Journal of Neurology 2015 Jul;22(7):1056-61

ARTÍCULO 2: Myasthenia gravis: descriptive analysis of life-threatening events in a recent nationwide registry

Autores: Ramos-Fransi A, Rojas-García R, Segovia S, Márquez-Infante C, Pardo J, Coll-CantíJ, Jericó I, Illa I and Myasthenia NMD-ES Study Group. Publicado en European Journal of Neurology 2015 Jul;22(7):1056-61.

Factor de impacto: 4.055. Primer cuartil.

Introducción:

Los pacientes con una forma generalizada de MG pueden presentar una afectación de la musculatura bulbar, que puede llegar a ser grave y comportar una situación de riesgo vital (SRV). Esto se produce cuando los pacientes presentan una disfagia severa con riesgo de aspiraciones y/o una insuficiencia respiratoria (estadios MGFA IVB o V). El riesgo de presentar una SRV y la evolución y respuesta a los diferentes tratamientos es muy variable, y hasta el momento no se han identificado marcadores demográficos, clínicos ni serológicos capaces de establecer el riesgo de padecer una SRV, ni capaces de predecir la evolución de ésta o la respuesta a las diferentes terapias.

Nos propusimos realizar un estudio para determinar la frecuencia y las características epidemiológicas y serológicas de los pacientes que sufrían una SRV en nuestra población, así como la evolución clínica de estos pacientes, con el objetivo de detectar los factores pronóstico de éstas.

Síntesis de metodología, resultados y discusión:

Realizamos un estudio retrospectivo de los pacientes con MG incluidos en el registro nacional de enfermedades neuromusculares, NMD-ES, que habían presentado una SRV entre los años 2000-2013. Para cada paciente se recogieron las variables demográficas, el estadio MGFA durante la SRV (MGFA IVB o V), el desencadenante de la SRV y si ésta se presentó como debut de la enfermedad o no. Se revisó el tratamiento inmunosupresor previo del paciente y el tratamiento recibido durante la SRV. La evolución clínica fue valorada mediante la

escala Post-Interventional Status (PIS) a los 30 días (mejoría, empeoramiento, sin cambios o muerte por MG), el tiempo hasta la extubación o el tiempo hasta la retirada de la sonda nasogástrica (SNG), según procediera. El análisis estadístico se realizó mediante test no paramétricos para variables independientes cuantitativas, y mediante el test exacto de Fisher para las variables categóricas. Se realizó también un análisis multivariante (regresión logística) para identificar los factores de riesgo de presentar una SRV. Se consideró significativo un valor $p < 0.05$.

De los 648 pacientes con una forma generalizada de MG incluidos en el registro, 62 (9.56 %) habían presentado una SRV. Este porcentaje es similar al descrito por algunos autores^{1,2}, aunque otros han propuesto tasas más elevadas, de hasta el 30%³⁻⁶. Tres de los pacientes presentaron 2 SRV cada uno. Las características clínicas del total de pacientes incluidos en el registro (n=648) y de los pacientes que presentaron SRV (n=62) se describen, respectivamente, en las **Tablas 1 y 2 del Artículo 2**. De los 62 pacientes que presentaron una SRV, 32 se encontraban en estadio MGFA V al requerir soporte ventilatorio, y 30 en estadio IVB al necesitar una SNG para alimentación. Cincuenta y siete pacientes tenían anticuerpos antiAChR (91.9%), 1 tenía anticuerpos antiMUSK y 4 eran seronegativos. En 21 pacientes se realizó una timectomía, y 8 de ellos tenían un timoma (12.9% del total). 35 eran hombres y 27 mujeres. 42 eran LoMG y 20 EoMG, lo que corrobora el aumento de incidencia de la MG en personas mayores^{7,8}. Se encontró una relación estadísticamente significativa entre la edad y el sexo, con un predominio de varones en los pacientes con un debut tardío de la enfermedad ($p=0.028$), tal y como ha sido descrito en la literatura^{5,7,9}.

Como dato destacable, 29 pacientes habían sido diagnosticados de MG con anterioridad y se encontraban bajo tratamiento inmunosupresor (IS), lo que representa que el porcentaje de pacientes tratados que presentó una SRV es sólo del 4.47% teniendo en cuenta la cohorte total de 648 pacientes. Esto demuestra la importancia de un diagnóstico precoz de la enfermedad, y sugiere que el tratamiento inmunosupresor puede ser uno de los principales factores preventivos de estas SRV.

Realizamos un análisis multivariante (regresión logística) para identificar los posibles factores de riesgo de sufrir una SRV, incluyendo la edad de debut, sexo, presencia de timoma y tipo de anticuerpos. Sin embargo, no se detectó ningún predictor estadísticamente significativo.

En los pacientes en estadio MGFA V, la mediana de tiempo hasta la extubación fue de 12 días [3-176 días], siendo significativamente más larga en los pacientes con EoMG ($p=0.019$). En los pacientes en estadio IVB la mediana hasta la retirada de la SNG fue de 13 días [1-434 días], y no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos de pacientes. Esta duración de las SRV está en concordancia con la duración de las crisis miasténicas descritas en la literatura^{6,10,11}. Aunque algunos estudios han señalado la edad como factor de riesgo para una intubación prolongada^{3,10}, otros coinciden con nosotros en que la edad no implica un peor pronóstico^{4,12}, e incluso se ha señalado que los pacientes mayores podrían tener una mejor respuesta a determinados fármacos inmunosupresores^{7,13,14}.

Otro dato destacable es que, en conjunto, un 20% de pacientes seguían intubados o continuaban necesitando una SNG para alimentación a los 30 días, con una mediana de duración de la SRV de 79 días [31-434]. Este alto porcentaje de pacientes que persistían en SRV al cabo de un mes del inicio ya había sido descrito por algunos autores¹⁰, aunque los motivos de esta evolución más tórpida son desconocidos y no existen marcadores que permitan predecir la respuesta a las diferentes terapias. En nuestro estudio tampoco ha sido posible determinar qué factores influyen en esta evolución más tórpida, puesto que no encontramos diferencias significativas entre los pacientes con una duración mayor de la SRV respecto al resto de pacientes.

En el 50% de casos la SRV ocurrió como debut de la enfermedad. En los pacientes previamente diagnosticados, la mitad de las SRV ocurrieron durante los 2 primeros años, con una mediana de duración hasta la SRV de 24 meses [3-406 días]. Sin embargo, 3 SRV tuvieron lugar más de 20 años después del diagnóstico, estando en un caso relacionado con una recurrencia de un timoma en forma de implante pleural. Por tanto, aunque la mayoría de

las SRV ocurren durante los primeros años de la enfermedad, estos eventos pueden presentarse de forma muy tardía, y se debe tener una especial precaución en los pacientes con antecedentes de timoma.

En 28 casos (43%) se detectó algún factor que podría ser el precipitante de la SRV. En concordancia con otros estudios, las infecciones fueron la causa más frecuente^{1,4-6,11,12}, detectándose en 18 casos. Cuatro de estos pacientes recibieron además tratamiento con quinolonas. La evolución de los pacientes no mostró diferencias significativas en función del desencadenante. No se encontró tampoco ninguna relación entre el tratamiento IS previo recibido y las infecciones. De acuerdo con nuestros resultados y con otros descritos en la literatura, las infecciones no representan un factor de riesgo para una evolución tórpida^{4,10}. Sin embargo, algunos estudios han descrito un mayor riesgo de ingreso en UCI e intubación en relación con las infecciones^{1,12}. El resto de posibles desencadenantes fueron identificados de forma anecdótica, por lo que parecen tener un bajo riesgo de desencadenar una SRV. Estos datos sugieren que quizás sería recomendable revisar la información que damos a los pacientes para evitar preocupaciones innecesarias.

En todos los casos el tratamiento inicial fue una tanda de IgEV durante 5 días (dosis de 2gr/Kg), y se inició en los 3 primeros días de la SRV. En 17 casos se efectuó un segundo tratamiento durante el primer mes: 11 recibieron IgEV (16.92%) y 6 se sometieron a una plasmaféresis (PLEX) (9.2%). En el pasado, la PLEX era el tratamiento de elección en las crisis miasténicas^{3,15}. Sin embargo, actualmente se ha demostrado que las IgEV son igual de eficaces¹⁶⁻¹⁸, y probablemente han sido el tratamiento de elección inicial debido a su manejo más sencillo. Todos los pacientes recibieron tratamiento con corticoides, y el 46.15% se trataron además con un segundo inmunosupresor.

La mortalidad en nuestra serie fue del 6.15% (4 pacientes), lo que está acorde con en 5-10% descrito en la literatura más reciente^{3,6,10,12}. La mortalidad asociada a estas situaciones ha disminuido drásticamente en las últimas décadas, probablemente gracias a

las nuevas técnicas de cuidados intensivos y las nuevas terapias inmunomoduladoras³. Los 4 fallecidos en nuestra serie eran pacientes con un debut tardío de la enfermedad y con múltiples comorbilidades, y en 2 de ellos existía una voluntad de limitar el esfuerzo terapéutico. Esto refleja que hoy en día la mayoría de muertes ocurren en relación a comorbilidades y complicaciones derivadas de una intubación prolongada, y no a la propia enfermedad¹⁰.

Una limitación de nuestro estudio es que los datos provienen exclusivamente de pacientes seguidos en unidades especializadas en hospitales de tercer nivel, y por tanto los resultados pueden no ser generalizables a todos los pacientes con MG. Otra limitación es que se trata de un estudio retrospectivo con un número limitado de pacientes. Sin embargo, el número de casos incluidos en nuestro estudio es mayor que en los estudios publicados hasta la fecha. Además, al incluir tanto los pacientes en estadio MGFA V como IVB se ofrece una perspectiva más amplia de lo que representan las situaciones de riesgo vital en esta patología.

Conclusiones:

Este trabajo demuestra que el porcentaje de Situaciones de Riesgo Vital en pacientes afectados de MG es bajo, especialmente en aquellos ya diagnosticados y tratados. Las infecciones son el desencadenante relacionado con más frecuencia, pero no comportan una peor evolución. La edad tampoco representa un factor de peor pronóstico. No se ha detectado ningún marcador clínico o inmunológico que se relacione con la evolución de estos pacientes y que por tanto pueda predecir la respuesta al tratamiento. Existe un porcentaje no despreciable de casos que no responden a las terapias usadas actualmente, lo que indica que son necesarios nuevos tratamientos más rápidos y efectivos para este subgrupo de pacientes.

Bibliografía Artículo 2

1. Sakaguchi H, Yamashita S, Hirano T, Nakajima M, Kimura E, Maeda Y, et al. Myasthenic crisis patients who require intensive care unit management. *Muscle and Nerve*. 2012;46(3):440–2.
2. Panda S, Goyal V, Behari M, Singh S, Srivastava T. Myasthenic crisis: a retrospective study. *Neurol India*. 2004;52(4):453–6.
3. Alshekhlee A, Miles JD, Katirji B, Preston DC, Kaminski HJ. Incidence and mortality rates of myasthenia gravis and myasthenic crisis in US hospitals. *Neurology*. 2009;72(18):1548–54.
4. Kalita J, Kohat a. K, Misra UK. Predictors of outcome of myasthenic crisis. *Neurol Sci*. 2014;35(7):1109–14.
5. Godoy DA, Mello LJV De, Masotti L, Napoli M Di. The myasthenic patient in crisis: an update of the management in Neurointensive Care Unit. *Arq Neuropsiquiatr*. 2013;71(9A):627–39.
6. Murthy JMK, Meena a K, Chowdary GVS, Naryanan JT. Myasthenic crisis: clinical features, complications and mortality. *Neurol India*. 2005;53(1):37–40.
7. Alkhawajah NM, Oger J. Late-onset myasthenia gravis: A review when incidence in older adults keeps increasing. *Muscle and Nerve*. 2013;48(5):705–10.
8. Aragonès JM, Bolívar I, Bonfill X, Bufill E, Mummany A, Alonso F, et al. Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology*. 2003;60(6):1024–6.
9. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol*. 2009;8(5):475–90.
10. Thomas CE, Mayer SA, Gungor Y, Swarup R, Webster EA, Chang I, et al. Myasthenic crisis: clinical features, mortality, complications, and risk factors for prolonged intubation. *Neurology*. 1997;48(5):1253–60.
11. Sharma S, Lal V, Prabhakar S, Agarwal R. Clinical profile and outcome of myasthenic crisis in a tertiary care hospital: A prospective study. *Ann Indian Acad Neurol*. 2013;16(2):203–7.
12. Spillane J, Hirsch NP, Kullmann DM, Taylor C, Howard RS. Myasthenia gravis - treatment of acute severe exacerbations in the intensive care unit results in a favourable long-term prognosis. *Eur J Neurol*. 2014;21(1):171–3.
13. Hellmann MA, Mosberg-Galili R, Steiner I. Myasthenia gravis in the elderly. *J Neurol Sci*. 2013;325(1-2):1–5.
14. Pascuzzi RM, Coslett HB, Johns TR. Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients. *Ann Neurol*. 1984;15(3):291–8.
15. Jani-Acsadi A, Lisak RP. Myasthenic crisis: Guidelines for prevention and treatment. *J Neurol Sci*. 2007;261(1-2):127–33.
16. Berrih-Aknin S, Frenkian-Cuvelier M, Eymard B. Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun*. 2014;48-49:143–8.
17. Gajdos P, Chevret S, Toyka K. Intravenous immunoglobulin for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(1):CD002277.
18. 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.

Myasthenia gravis: descriptive analysis of life-threatening events in a recent nationwide registry

A. Ramos-Fransi^{a,*}, R. Rojas-García^{a,b,c,*}, S. Segovia^a, C. Márquez-Infante^d, J. Pardo^e, J. Coll-Cantí^f, I. Jericó^g, I. Illa^{a,b,c} and Myasthenia NMD-ES Study Group[†]

^aNeuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; ^bMedicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona; ^cCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia; ^dDepartment of Neurology and Neurophysiology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla; ^eDepartment of Neurology, Hospital Clínico de Santiago, Santiago; ^fDepartment of Neurology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona; and ^gDepartment of Neurology, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Spain

Keywords:

feeding tube, immunomodulatory therapy, myasthenia gravis, myasthenic crisis, outcome measures, post-intervention status, weaning

Received 13 October 2014
Accepted 6 February 2015

European Journal of Neurology 2015, **22**: 1056–1061

doi:10.1111/ene.12703

Background and purpose: Myasthenia gravis (MG) may become life-threatening if patients have respiratory insufficiency or dysphagia. This study aimed to determine the incidence, demographic characteristics, risk factors, response to treatment and outcome of these life-threatening events (LTEs) in a recent, population-based sample of MG patients.

Methods: A retrospective analysis of MG patients who presented with an LTE between 2000 and 2013 was performed. Participants were identified from a neuromuscular diseases registry in Spain that includes 648 patients with MG (NMD-ES).

Results: Sixty-two (9.56%) patients had an LTE. Thirty-two were classified as class V according to the MG Foundation of America, and 30 as class IVB. Fifty per cent were previously diagnosed with MG and median duration of the disease before the LTE was 24 months (3–406). The most common related factor was infection ($n = 18$). All patients received intravenous human immunoglobulin; 11 had a second infusion and six had plasma exchange. Median time to feeding tube removal was 13 days (1–434). Median time to weaning from ventilation was 12 days (3–176), and it was significantly shorter in late onset MG (≥ 50 years) ($P = 0.019$). LTEs improved < 2 weeks in 55.8% but did not improve until after 1 month in 20% of patients. Four patients died. No other factors influenced mortality or duration of LTEs.

Conclusions: The percentage of LTEs in MG patients was low, particularly amongst those previously diagnosed and treated for the disease. The significant percentage of treatment-resistant LTEs indicates that more effective treatment approaches are needed for this vulnerable sub-population.

Introduction

Myasthenia gravis (MG) is a heterogeneous autoimmune disease that affects the neuromuscular junction [1,2]. Clinically, patients may present an ocular or a

generalized form of the disorder. In the generalized form, weakness can sometimes be severe, and at times life-threatening. MG can affect people of all ages but several series have shown that the incidence is highest in patients over 70–80 years [3–5]. Immunologically, most patients have antibodies to acetylcholine receptor (AChR), but some have antibodies to muscle-specific kinase (MuSK) and other neuromuscular targets [6–8]. Thymus status can also vary widely, ranging from normal to hyperplasia or thymoma [1,2]. The quality of life of these patients has improved with

Correspondence: I. Illa, Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain (tel.: 0034 935565986; fax: 0034 935565602; e-mail: iilla@santpau.cat).

*These authors contributed equally to this work.

†The Myasthenia NMD-ES Study Group members are given in the Appendix.

chronic immunosuppression and immunomodulatory agents but response to treatment is variable [9–13].

Life-threatening events (LTEs) in MG are related to bulbar signs, either respiratory insufficiency or dysphagia. When these signs occur, patients are classified as MG class V or class IVB according to the MG Foundation of American (MGFA) [14]. The mortality rate of these LTEs declined from >40% in the 1960s to 5%–10% in the 1970s with the development of intensive care techniques and the use of immune modulatory therapies such as plasmapheresis (PLEX) or intravenous human immunoglobulin (IVIg) [15]. However, some patients are still resistant to therapy, but no consistent prognostic factors have been identified to determine this resistant subgroup.

The goal of our study was to determine the frequency and characteristics of LTEs in our population. A survey was performed of patients with MG class V or IVB in an MG cohort of patients in Spain who required PLEX or IVIg to improve following an LTE. The clinical and immunological profile, precipitating factors, immunosuppressive (IS) drugs, LTE therapy and outcome in these patients were analysed.

Materials and methods

Nationwide registry design

This study was based on information taken from a nationwide registry established as part of the NMD-ES Project (Spanish Registry of Neuromuscular Diseases), founded in 2010 and funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The aim of this project is to create a specific registry for basic and clinical research for each neuromuscular disease. It is a neurologist-driven registry that collects retrospective and prospective data from neuromuscular units at 25 university hospitals in Spain. Information collected includes 60 items related to demographic, clinical, immunological and therapeutic data, and patients' follow-up. Neurologists are required to update information annually and whenever a significant clinical event, such as an LTE, occurs. For each follow-up entry, neurologists must enter data concerning clinical status, present treatment and related factors in the case of exacerbation of symptoms.

The NMD-ES registry was designed in accordance with current Spanish legislation on biomedical research and international standards. Each participating hospital submitted the project to its corresponding ethics committee for formal approval. All patients were required to sign an informed consent form.

Patients

The NMD-ES registry includes a total of 4315 patients. To perform this study, information was gathered from the 648 patients with a generalized form of MG. Patients who presented with an LTE from January 2000 to December 2013 were identified. LTEs were classified as MGFA class V if patients required intubation or IVB if patients required a feeding tube [15]. The decision to intubate varied according to the protocol at each centre and each individual patient. Patients were classified as late-onset myasthenia gravis (LoMG) if they were aged 50 or older at the debut of the disease, and early-onset myasthenia gravis (EoMG) if they were under 50 at the debut of the disease.

Methods

Demographic, clinical and treatment data were collected from the registry for each patient who had an LTE. Demographic data obtained were sex, age of onset of myasthenia, immunological data, thymectomy and presence of thymoma. Whether the LTE was the presenting form of MG was noted. In previously diagnosed patients, the median time from the onset of the disease to the LTE was calculated. Whether IS drugs were taken at the time of the LTE was analysed, and the drugs were grouped into steroids, steroids plus other IS drugs, and IS drugs other than steroids alone. All factors that could have precipitated the LTE were recorded, such as infections, decrease of dose treatment, use of other drugs, thymoma recurrence, surgery, psychological stress, others, and no factor. Whether patients were administered IVIg or PLEX at diagnosis of the LTE was reviewed, and whether steroids or other IS drugs were started. If patients received re-treatment with IVIg or PLEX during the first month due to a lack of improvement after the initial treatment was also recorded.

The clinical outcome was analysed according to the post-intervention status at day 30 (improvement, unchanged, worsened, or died of MG) [14], time to weaning in MGFA V patients, and time to removal of the feeding tube or to start of oral feeding without any support in MGFA IVB patients. This information was obtained from the patient's clinical history at each centre.

Statistical analysis

Data analysis was performed using IBM-SPSS (version 22). Quantitative variables were described as median and minimum and maximum. To compare

differences in continuous variables non-parametric tests for independent samples were used – either the Mann–Whitney *U* test or the Kruskal–Wallis test depending on the number of groups – due to lack of a normal distribution. To compare the relation with categorical variables Fisher’s exact test was used, and the frequency and absolute number of cases were described. Additionally, a multivariate analysis (logistic regression) was used to identify predictors of an LTE in all patients with generalized MG, including age at onset of MG, gender, presence of thymoma and type of antibody. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Data from the 648 patients with generalized MG included in the NMD-ES registry are shown in Table 1. The median follow-up was 9 years (1–49 years).

From the total of 648 patients, 62 patients (9.56%) with an LTE were identified (Table 2). Three patients had two LTE episodes. Of the 62 patients, 32 required mechanical ventilation (MGFA V) and 30 needed a feeding tube (MGFA IVB). Thirty-five were men and 27 were women. Forty-two were classified as LoMG and 20 as EoMG. Twenty-nine of the 62 were diagnosed before the LTE and were under IS treatment for MG. From the total group of 648 patients, therefore, only 4.47% of the LTEs occurred in previously diagnosed and treated patients.

A significant relation between age and gender in patients who presented an LTE was found, as 28 of the 35 men were LoMG and only seven men had EoMG, whilst 13 of the 27 females were EoMG and

Table 1 Demographic data of the 648 patients with generalized mg (number, %)

Gender	
Women	357 (55.1)
Men	291 (44.9)
Age at onset of MG	
EoMG	272 (42)
LoMG	376 (58)
Type of antibody	
AChR	537 (82.9)
MUSK	28 (4.3)
Seronegative	83 (12.8)
Thymoma	
Yes	68 (10.5)
No	580 (89.5)
Treatment	
Steroids	272 (42)
Steroids + other IS	230 (35.5)
Other IS alone	24 (3.7)
No IS treatment/only Mestinon	122 (18.8)

Table 2 Life-threatening events features

Clinical features of the 62 patients with LTE (number, %)	
Gender	
Women	27 (43.5)
Men	35 (56.5)
Age	
EoMG (<50 years old)	20 (32.3)
LoMG	42 (67.7)
MGFA	
IV B	30
V	32
Factors related to the 65 LTE (number, %)	
None	37 (56.9)
Infection	18 (27.7)
Reduction of IS dose	3 (4.6)
Commencement of steroid treatment	1 (1.5)
Use of other drugs	1 (1.5)
Thymoma recurrence with pleural implant	1 (1.5)
Psychological stress	3 (4.6)
Surgery	1 (1.5)
Treatment of the 65 LTE (number, %)	
IglV 5 days	65 (100)
Single course	48 (73.8)
Re-treatment with IglV	11 (16.9)
Re-treatment with PLEX	6 (9.2)
Duration of the LTE (median days)	
Time to weaning (MGFA V)	12 days (3–176)
EoMG	54 days
LoMG	9.5 days ($P = 0.019$)
Time to removal of the feeding tube (MGFA IVB)	13 days (1–434)
EoMG	47.5 days
LoMG	11.5 days (n.s.)

14 were LoMG ($P = 0.028$). This relation was also found when all the 648 patients were considered ($P < 0.01$). Fifty-seven of the 62 patients who had an LTE (91.9%) had antibodies against AChR, one had antibodies against MuSK and four were seronegative. Twenty-one of the 62 patients (33.9%) underwent a thymectomy (mean age 35 years). Eight of these patients had a thymoma (12.9%) (mean age 45 years).

None of the factors analysed with the multivariate analysis were able to predict the LTE, as characteristics of the 62 patients who suffered an LTE did not differ from those of the 586 who did not.

In patients with MGFA V status, median time to weaning was 12 days (3–176), and it was significantly longer in EoMG than in LoMG ($P = 0.019$). Statistical significance did not vary when adjusting for mortality. In patients with MGFA IVB status, the median time to removal of the feeding tube or to starting oral feeding without support was 13 days (1–434). In 55.8% of LTEs the median time to weaning or to removal of the feeding tube was <15 days. However, 20% of patients were still intubated or continued to require a feeding tube after 30 days, with a median

time to improvement of 79 days (31–434). Characteristics of this resistant group did not differ from those with a shorter duration of the LTE. Treatment received during the first month in these patients was more than one IVIg course in 46.2%, both IVIg and PLEX in 23.1% and a single IVIg course in 30.8%. All these patients received steroids, and other IS drugs were added in 46.15%.

Four patients died (6.15%), all from the LoMG group. In one case, MG was diagnosed at admission for the LTE, although the patient reported a 1-year history of fatigability. In the three other patients, death occurred within 2 years of diagnosis. Death occurred between day 15 and day 45 from admission in all cases. All four patients had severe comorbidities (cardiopathy, renal insufficiency, dementia and diabetes) and two had do-not-resuscitate orders.

In 50% of cases, the LTE occurred as the first manifestation of the disease, and it was more frequent amongst patients with an LoMG (25/42) than in patients with an EoMG (6/20), although this was not significant ($P = 0.056$). In the 31 patients who were previously diagnosed, the median duration of the disease before the LTE was 24 months (3–406 months); that is, half the previously diagnosed patients had the LTE within the first 2 years. In three cases, the LTE occurred more than 20 years after MG was diagnosed. In one of these cases it was related to a thymoma recurrence with a pleural implant 21 years after the diagnosis. In the second case it was associated with an infection, and in the third it was not related to any specific factor. There were no differences in any of the outcome measures between the episodes occurring as the first manifestation and those occurring in previously diagnosed and treated patients.

Factors that could have precipitated the LTE were described in 28 cases (43%). Infections were the most frequent factor and were recorded in 18 LTEs. Four of these patients were on antibiotic treatment when the crisis occurred. All four were treated with quinolones. No significant relation was found between infection and the use of immunosuppression at the moment of the LTE, as nine of the infected patients were previously under IS treatment and nine were not. The other related factors recorded were a decrease in IS dose (three cases), psychological stress (three), thymoma recurrence with pleural implant (one), commencement of steroid treatment (one), use of other drugs (one calcium antagonists) and surgery (one). Regarding the related factors of the LTE, no statistical differences were found in any of the outcome variables.

Treatment was initially performed with a 2 g/kg/5-day course of IVIg in all cases, and it was prescribed

within the first 3 days of the LTE in all of them. At day 30, the post-intervention status of the 48 patients (73.85%) who received a single course of IVIg was improved in 42 patients, unchanged in four and died of MG in two.

Re-treatment was required in 17 episodes (26.15%) within the first month due to a lack of improvement. Eleven received a second course of IVIg (16.92%) and six received PLEX (9.2%). Seven of the 11 IVIg and three of the six PLEX patients had not improved by day 30. Two of these patients died. No adverse effects were reported with IVIg or PLEX.

A total of 29 patients were taking IS therapy before the LTE occurred (steroids in 19 cases, steroids plus other IS drugs in eight and an IS drug other than steroids in two). Thirty-three patients were prescribed steroids during the LTE. Thirteen of the 33 were prescribed a second IS drug during the first month (five azathioprine, six cyclosporine A, two mycophenolate mofetil).

Discussion

The percentage of MG patients who had an LTE in our sample was low, particularly amongst those previously diagnosed and treated for the disease. The most common related factor was infection. Median time to improve from an LTE was 12–13 days, and 20% of patients did not improve after 1 month, regardless of aggressive therapy. Older age and the presence of related factors did not imply a worse outcome.

The 9.56% of MG patients who presented an LTE in our study is in accordance with some data reported in the literature [16,17], although other authors reported rates around 15%–30% [15,18–20]. The percentage of patients with an LoMG (67.7%) supports an increasing incidence in older adults [3–5]. Like other authors, predominance in males in this late onset group was also found [2–4,19]. Of particular note in our study is the low percentage of patients who were previously diagnosed and treated for MG and had an LTE. This emphasizes the relevance of early diagnosis and suggests that immunotherapy may be the best preventing factor of LTEs.

The median duration of the LTE in our study, 12–13 days, is in agreement with the median duration of myasthenic crises in the literature [20–22]. Interestingly, EoMG patients were found to have a significantly longer time to weaning than LoMG patients, although this was not observed in the other outcome measures. Although older age has been described as a risk factor for prolonged intubation in some papers [15,21], like ourselves, not all authors report age as a poor outcome factor [18,23]. Moreover, some authors

described a better response to immune therapies in LoMG patients than in EoMG patients [3,4,24].

Mortality related to LTEs in our series (6.15%) is in accordance with the 5%–10% reported in other recent studies [15,20,21,23]. LTE-related mortality has declined from 40% since the 1960s, possibly due to the new immunomodulatory treatments and critical care techniques [15]. The cause of death has also changed over the last decades. Currently, fewer deaths are attributed to the crisis itself and more events are related to complications of prolonged intubation or intensive care unit stay [21]. In our series, all patients who died had multiple comorbidities, and half of them had do-not-resuscitate orders. These results support those from some other authors [21].

Most LTEs occurred as the debut of MG or within the first 2 years from onset of the MG, and this is in accordance with data in the literature [17,18,20]. However, three patients in our study presented an LTE 20 years after the diagnosis. In one case this was related to thymoma recurrence, suggesting special caution should be taken with this subgroup of patients despite the duration of the disease.

Regarding the factors that could have precipitated the LTE, in agreement with previous studies [16,18–20,22,23], infections were the most commonly reported events. No significant relation was found between infection and immunosuppression, although a possible relation has been speculated. In accordance with our results and some reports in the literature, infections do not imply longer duration of the LTE [18,21]. However, in some studies the risk of admission to the intensive care unit and need for ventilation was higher when infections occurred than when other triggers were present [16,23]. With the exception of infections and some antibiotics, the remaining known precipitating factors seem to have a low chance of causing an LTE. Therefore, it might be advisable to review the information given to patients about possible exacerbating factors in order to avoid their unfounded concern.

In the past, PLEX was the treatment of choice in MG [15,25]. Nowadays, several studies have demonstrated a similar response with IVIg and PLEX in MG exacerbations [8,12,26]. Although both medications were equally available to the participating centres in this study, all centres chose IVIg as the first line treatment. As the two drugs have a similar effect and price in our setting, this preference could be due to the easier management of IVIg.

It is important to note that as many as 20% of patients in our study continued to require ventilation or dysphagia management 1 month after the LTE due to lack of efficacy of the drugs administered. This is

in accordance with the reported 25% of patients who remained intubated 1 month after a myasthenic crisis [21]. The cause of this treatment resistance is not known, and no biomarkers are available to determine whether patients will improve with IVIg, PLEX or immunosuppression, or why some patients are resistant to these therapies. Our results emphasize the need to find new biomarkers and to improve our therapeutic arsenal with new, more efficacious and faster drugs.

One limitation of our study is that data were exclusively recorded from neuromuscular units in reference hospitals and results might not therefore be generalized to all patients with MG. Another limitation is the retrospective nature of our study and the limited number of patients. Nevertheless, in the setting of rare diseases such as MG, sample size is generally small and our sample is larger than most studies to date. Moreover, the inclusion of both MGFA V and IVB status exemplifies a representative population of patients with an LTE and confers a wider perspective on this subject matter.

In conclusion, patients with diagnosed and treated MG have a low risk of developing an LTE. Current treatment in intensive care units improves prognosis in most cases. However, effective treatment has yet to be developed for patients resistant to current therapies.

Acknowledgements

The authors thank Carolyn Newey for editorial support, Ignasi Gich for help in the statistical analysis, and patients with MG for contributing their data to this registry. The NDM-ES project is supported by grants PI 12/00772 to RR and PI13/937 to II (Fondo de Investigación Sanitaria, ISCIII, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain).

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no financial or other conflicts of interest.

References

1. Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1994; **330**: 1797–1810.
2. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol* 2009; **8**: 475–490.
3. Alkhawajah NM, Oqer J. Late-onset myasthenia gravis: a review when incidence in older adults keeps increasing. *Muscle Nerve* 2013; **48**: 705–710.
4. Hellmann MA, Mosberg-Galili R, Steiner I. Myasthenia gravis in the elderly. *J Neurol Sci* 2013; **325**: 1–5.

5. Aragonès JM, Bolívar I, Bonfill X, *et al.* Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology* 2003; **60**: 1024–1026.
6. Vincent A, Bowen J, Newsom-Davis J, McConville J. Seronegative generalised myasthenia gravis: clinical features, antibodies, and their targets. *Lancet Neurol* 2003; **2**: 99–106.
7. Verschuuren JJ, Huijbers MG, Plomp JJ, *et al.* Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmun Rev* 2013; **12**: 918–923.
8. Berrih-Aknin S, Frenkian-Cuvelier M, Eymard B. Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun* 2014; **48–49**: 143–148.
9. Querol L, Illa I. Myasthenia gravis and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol* 2013; **26**: 459–465.
10. Sanders DB, Evoli A. Immunosuppressive therapies in myasthenia gravis. *Autoimmunity* 2010; **43**: 428–435.
11. Skeie GO, Apostolski S, Evoli A, *et al.* European Federation of Neurological Societies. Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol* 2010; **17**: 893–902.
12. Gajdos P, Chevret S, Toyka KV. Intravenous immunoglobulin for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; **12**: CD002277.
13. Díaz-Manera J, Rojas García R, Illa I. Treatment strategies for myasthenia gravis: an update. *Expert Opin Pharmacother* 2012; **13**: 1873–1883.
14. Jaretzki A, Barohn RJ, Ernstoff RM, *et al.* Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. Myasthenia gravis recommendations for clinical research standards. *Neurology* 2000; **55**: 16–23.
15. Alshekhlee A, Miles JD, Katirji B, Preston DC, Kaminski HJ. Incidence and mortality rates of myasthenia gravis and myasthenic crisis in US hospitals. *Neurology* 2009; **72**: 1548–1554.
16. Sakaguchi H, Yamashita S, Hirano T, *et al.* Myasthenic crisis patients who require intensive care unit management. *Muscle Nerve* 2012; **46**: 440–442.
17. Panda S, Goyal V, Behari M, Singh S, Srivastava T. Myasthenic crisis: a retrospective study. *Neurol India* 2004; **52**: 453–456.
18. Kalita J, Kohat AK, Misra UK. Predictors of outcome of myasthenic crisis. *Neurol Sci* 2014; **35**: 1109–1114.
19. Godoy DA, Mello LJ, Masotti L, Di Napoli M. The myasthenic patient in crisis: an update of the management in neurointensive care unit. *Arq Neuropsiquiatr* 2013; **71**: 627–639.
20. Murthy JM, Meena AK, Chowdary GVS, Naryanan JT. Myasthenic crisis: clinical features, complications and mortality. *Neurol India* 2005; **53**: 37–40.
21. Thomas CE, Mayer SA, Gungor Y, *et al.* Myasthenic crisis: clinical features, mortality, complications, and risk factors for prolonged intubation. *Neurology* 1997; **48**: 1253–1260.
22. Sharma S, Lal V, Prabhakar S, Agarwal R. Clinical profile and outcome of myasthenic crisis in a tertiary care hospital: a prospective study. *Ann Indian Acad Neurol* 2013; **16**: 203–207.
23. Spillane J, Hirsch NP, Kullmann DM, Taylor C, Howard RS. Myasthenia gravis – treatment of acute severe exacerbations in the intensive care unit results in a favorable long-term prognosis. *Eur J Neurol* 2014; **21**: 171–173.
24. Pacuzzi RM, Coslett HB, Johns TR. Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients. *Ann Neurol* 1984; **15**: 291–298.
25. Jani-Acsadi A, Lisak RP. Myasthenic crisis: guidelines for prevention and treatment. *J Neurol Sci* 2007; **261**: 127–133.
26. Barth D, Nabavi Nouri M, Ng E, New P, Brill V. Comparison of IVIg and PLEX in patients with myasthenia gravis. *Neurology* 2011; **76**: 2017–2023.

Appendix

The Myasthenia NMD-ES Study Group, other participants (in alphabetical order): Alberti Aguiló MA (Neurology, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospital de Llobregat), Bataller Alberola L (Neurology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia), Berciano Blanco J (Neurology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander), Casanovas Pons C (Neurology, Hospital Universitari de Bellvitge, Hospital de Llobregat), Díaz-Manera J (Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona), Fernández Torró R (Neurology, Hospital de Donostia – Biodonostia), García Sobrino T (Neurology, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago), Gómez Caravaca MT (Neurology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla), Guerrero Sola A (Neurology, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid), Gutiérrez Gutiérrez G (Neurology, Hospital Universitario Infanta Sofía, Madrid), López de Munain Arregui A (Neurology, Hospital Universitario de Donostia – Biodonostia), Martínez Piñero A (Neurology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona), Mendoza Grimón MD (Neurology, Hospital Universitario Gran Canaria Negrín), Muñoz Blanco JL (Neurology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid), Pelayo Negro AL (Neurology, Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Santander), Querol L (Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona), Sevilla Mantecón T (Neurology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Valencia).

Conclusiones finales

Conclusiones de los trabajos publicados

Para la hipótesis “Existe un perfil característico de miRNA circulantes en el suero de pacientes con MG que puede ser de utilidad como biomarcador de esta patología autoinmune”, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. El estudio de miRNAs en suero puede ser útil como biomarcador patogénico de la MG, puesto que estos pacientes presentan un perfil de miRNAs circulantes característico en comparación con los controles sanos, concretamente de miR15b, miR122, miR140-3p, miR185, miR192, miR20b y miR885-5p.
2. Los subgrupos de pacientes EoMG y LoMG probablemente compartan un mecanismo fisiopatogénico similar, ya que el perfil de miRNAs es común en ambos grupos.
3. Los miRNAs circulantes no parecen una herramienta útil para detectar los pacientes con MG asociada a timoma, puesto que estos pacientes no presentan un perfil característico de miRNAs. Sin embargo, no se puede descartar una limitación estadística debido al pequeño tamaño muestral.
4. Los miRNAs descritos (miR15b, miR122, miR140-3p, miR185, miR192, miR20b y miR885-5p) no son útiles como biomarcadores de respuesta al tratamiento, ya que la terapia inmunosupresora y la timectomía no modifican el perfil de estos miRNAs.

Para la hipótesis “Las situaciones de riesgo vital son frecuentes en los pacientes con MG. La edad y el desencadenante infeccioso son factores de riesgo para una evolución tórpida y una peor respuesta al tratamiento” podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Las Situaciones de Riesgo Vital son poco frecuentes en nuestra población.
2. La terapia inmunosupresora podría ser uno de los principales factores protectores ante las SRV, dado que el porcentaje de Situaciones de Riesgo Vital es especialmente bajo en los pacientes con MG que se encontraban bajo tratamiento inmunosupresor.
3. Las infecciones son el principal factor desencadenante de las SRV, pero no comportan una peor evolución.
4. La edad avanzada no representa un factor de peor pronóstico en la evolución de las SRV.

4 ■ CONCLUSIONES FINALES

5. La búsqueda de marcadores pronósticos en pacientes con MG y SRV ha sido negativa, puesto que no se ha podido detectar ningún marcador clínico o inmunológico capaz de predecir la evolución o la respuesta al tratamiento de estos pacientes.
6. Existe un porcentaje significativo de pacientes que presentan SRV prolongadas, lo que significa que se precisan nuevas terapias más rápidas y eficaces para tratar las SRV.
7. Las largas listas de factores desencadenantes de exacerbaciones en pacientes con MG debería ser revisada, dado que a parte de las infecciones y algunos fármacos el resto de desencadenantes de SRV parecen anecdóticos.

Conclusiones generales

La MG es una enfermedad muy heterogénea que puede suponer un reto diagnóstico y un manejo difícil, lo que señala la necesidad de disponer de buenos marcadores para el correcto abordaje del paciente.

Hasta el momento se conocen pocos biomarcadores en esta enfermedad. Los Ac antiAChR son útiles para el diagnóstico, pero sus valores absolutos no correlacionan con la gravedad. Algunos autores han señalado que los títulos de Ac antiAChR disminuyen después del tratamiento y podrían ser de ayuda para evaluar la respuesta terapéutica, aunque a día de hoy no se ha demostrado que ofrezcan ningún beneficio respecto a la evaluación puramente clínica. Los Ac antiMUSK son marcadores diagnósticos y clínicos, puesto que su valor absoluto correlaciona mejor con el estadio del paciente. Además, los Ac antiMUSK predicen una mejor respuesta a tratamientos específicos como el Rituximab. El resto de autoanticuerpos descritos pueden ser de utilidad diagnóstica en un grupo reducido de casos, pero tampoco ofrecen ventajas para la monitorización clínica ni terapéutica. El estudio de fibra aislada apoya el diagnóstico y en manos expertas puede correlacionar con el estadio clínico. Sin embargo, la dificultad técnica y la gran variabilidad inter-observador hacen que tampoco sea un buen biomarcador.

El análisis del perfil de miRNAs en suero de pacientes con MG ofrece una nueva perspectiva. Nuestro estudio demuestra que existen 7 miRNAs circulantes que se encuentran en niveles más bajos en el suero de pacientes con MG comparados con controles (miR15b, miR122, miR140-3p, miR-185, miR-192, miR20b, miR885-5p), y que éstos son comunes en diferentes subtipos de pacientes y no se modifican con el tratamiento. Otros estudios publicados recientemente describen además 2 miRNAs que se encuentran en niveles más altos en el suero de pacientes con MG no tratados (miR150-5p, miR21), y que éstos tienden a disminuir después del tratamiento inmunosupresor aunque no correlacionan bien con el estadio clínico. En conjunto estos resultados señalan que el estudio de miRNAs circulantes en MG puede ser de utilidad para conocer mejor la enfermedad, si bien su uso como biomarcadores clínicos o de respuesta al tratamiento no queda aún bien establecido.

Las SRV representan situaciones críticas para el paciente con MG, y requieren de un enfoque preciso para ofrecer un manejo óptimo con la mayor brevedad. Disponer de marcadores que predigan la evolución clínica en estas situaciones o la respuesta al tratamiento sería de gran utilidad. Sin embargo, a día de hoy no se conoce con certeza ningún dato serológico, clínico o demográfico que pueda ofrecer esta información. Nuestro estudio aporta información relevante respecto al estado actual de las SRV en nuestro país, a resaltar su baja frecuencia especialmente en pacientes tratados y la larga duración la SRV en un porcentaje no despreciable de casos. Sin embargo, no ha detectado ningún marcador pronóstico en estos pacientes.

Los resultados de ambos trabajos señalan que el estudio de nuevos marcadores diagnósticos y pronósticos en la MG debe proseguir para ofrecer un abordaje óptimo e individualizado a cada uno de los pacientes.

