



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>

Factores genéticos que influyen en las formas familiares y esporádicas de miastenia gravis autoinmune

TESIS DOCTORAL

MARIA SALVADÓ FIGUERAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

Directores: Dr. Josep Gamez Carbonell y Dr. Jose Manuel Vidal Taboada

Tutor: Dr. José Álvarez-Sabin

Año 2019

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA



Als meus avis, per la saviesa

A en Dani i en Martí, per la fortalesa

AGRAÏMENTS

Al Dr. Josep Gamez, coordinador de la Unitat de Malalties Neuromusculars i rares-CSUR-ERN_NMD del Servei de Neurologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i del Grup de Recerca en Sistema Nerviós Perifèric del VHIR i director de la meua tesi doctoral, per haver-me fet confiança i haver-me brindat l'oportunitat de formar part del seu projecte professional des que vaig finalitzar la meua formació com a especialista en neurologia. Pels anys que hem compartit i treballat tan intensament. Per oferir-me la millor formació clínica i en recerca clínicobàsica possible en el camp de les malalties neuromusculars, amb un entusiasme i energia envejables. Finalment, agrair-li el seu suport, dedicació i rigor en la revisió de la tesi, que han fet possible el resultat que presento aquí.

Al Dr. Jose Manuel Vidal Taboada, investigador del Grup de Recerca en Sistema Nerviós Perifèric i codirector de la tesi, per transmetre'm els seus coneixements en l'àrea d'investigació clínica, bàsica i translacional necessàries per poder dur a terme aquest projecte. Per la seva paciència, el seu suport incondicional i constant; per la seva dedicació meticulosa a la revisió de la tesi; per animar-me a seguir treballant en els moments més difícils.

Al Dr. José Álvarez Sabin, cap de Servei de Neurologia de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i tutor de la meua tesi, per la seva amabilitat, interès i disponibilitat durant els anys dedicats a la seva elaboració.

Molt especialment, als pacients de la Unitat de Multidisciplinària de Miastènia gravis de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i els seus familiars, pel seu interès, la seva paciència i col·laboració en els diversos treballs d'investigació que conformen aquesta tesi.

Al Dr. Jose Luis Caro Oleas, la Dra. M. José Herrero Mata i al Dr. Francesc Rudilla del Banc de Sang i Teixits de Barcelona, per la seva ajuda, assessorament i col·laboració en aquest treball de tesi.

A tots els meus companys del Servei de Neurologia i del laboratori de recerca del VHIR, amb els quals he compartit els darrers anys de la meua carrera professional, en especial a la Mercè Badia, la Gisela Gili, l'Estefania Soler i la Carla Aguilar, per la seva tasca indubtablement indispensable d'obtenció i processament de mostres i molt més, sempre amb un somriure. A la Jessica Fernández, per enamorar-me del laboratori.

A l'Emilio Syriani, la Candi Salvans, la Cecília García, la Laura Lorenzo, l'Eva López Toledano, l'Èlia Sanjuan, la Consuelo García i la Laura Zalba, els meus companys i 'mestres' d'investigació i peripècies. A les meves companyes actuals i passades de la consulta de malalties neuromusculars: Sonia Cazorla, Alba Montoliu, Ana Belen Canovas, Sara Quiñoá, Alba Sierra i Marisol Gallardo. A tots els residents de neurologia i altres especialitats amb els quals he après i a qui he intentat ensenyar de la millor manera possible. A la Caty Carrera, l'Anna Penalba i l'Israel Fernández, del grup de recerca en Malalties Neurovasculars del VHIR, pel seu assessorament i ajuda.

A la Sílvia Ruiz, secretaria del Servei; a l'Eulàlia Joseph i a la Núria Prim, coordinadores del VHIR i, evidentment, a la Pilar, en Rai i en Tao per la seva amable ajuda tècnica i assessorament. Al personal administratiu, d'infermeria, auxiliars, zeladors, neteja i manteniment amb qui hem compartit molts o algun moment, moltes gràcies.

Als professionals del Servei de Neurofisiologia Clínica de l'Hospital, especialment a les Dres. Raguer i Gratacòs, la Dra. Minovés, la Dra. Moncho i a l'Alejandro Martínez de la Ossa. Als professionals i companys dels Serveis de Cirurgia Toràctica, Anestesiologia i Reanimació i Alt Risc Obstètric, així com als companys de la Unitat Multidisciplinària (UME).

Als meus professors de batxillerat, en especial a en Josep Mejías, la Teresa Villoslada i la Margarita Pagès i a la resta de l'equip docent de l'IESI La Bisbal, per preparar-me les ales. A l'equip docent de la Facultat de Medicina i la UD Vall d'Hebron de la UAB per fer que es moguessin. Als professionals que em van transmetre la seva vocació per la medicina, molt especialment, al Dr. Jaume Escolà, al Dr. Jaume Campistol i a la Dra. Eugenia Olmos, que em van animar a volar i em van ensenyar els valors de l'esforç i l'empatia i a tots aquells que algun cop em van ajudar a tornar a aixecar-me, sobretot al Dr. Ventura i la Dra. Ey.

Als creadors del software online Biorender, per facilitar-me la creació d'imatges científiques de bona qualitat i la possibilitat de personalitzar-les.

Finalment, a tota la meva família, molt especialment a en Dani, per la seva amistat, el seu amor i confiança; a en Martí per donar-me forces quan més les necessitava; als meus pares, per recordar-me sempre que mai t'has de rendir; a la meva germana Cristina pel "tu pots, tu pots"; a ella i en Pau per la seva ajuda i expertesa incondicional, i a l'Anna pel *savoir faire* en el disseny de la tesi. A en Pol, per ser l'alegria personificada; als meus avis Amor i Carme, Joan i Nuri, les meves ties Nuri i Dolors, en Quei, en Vador, en Joan, en Guillem i la Núria, la Carme, en Jose i l'Albert per estar sempre al meu costat i donar-me suport. I a la resta de la família de la Bisbal, Barcelona i Cardedeu, que no em vull deixar a ningú, gràcies!

I als nostres amics, perquè, a més de ser-hi sempre, us heu preocupat per l'avenç de la tesi i heu entès el que suposava per a mi, particularment a la Vane i en Javi, la Reme, la Roser, l'Alba i en Gerard, l'Anna i en Jordi, l'Aleix i Laia, la Núria i en Marçal, en Jaume, l'Iñaki i la Marina i l'Anna March... i a tots els nens i nenes que ens fan ser més feliços i van ampliant les colles mica en mica.

ABREVIATURAS

AChR	receptor nicotínico de acetilcolina
AD	autosómico dominante
ADN	ácido desoxiribonucleico
AIRE	gen del Regulador Autoinmune
AR	autosómico recesivo
ARN	ácido ribonucleico
ASMA s	anticuerpos contra las proteínas del músculo estriado, del inglés <i>anti-striated muscle antibodies</i>
AZA	Azatioprina
CACNA1S	gen del <i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1S</i>
CCL21	gen del <i>C-C Motif Chemokine Ligand 21</i>
CG	centro germinal
CIDP	poliradiculoneuropatía inflamatoria crónica desmielinizante
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CMS	síndromes miasténicos congénitos, del inglés <i>congenital myasthenic syndromes</i>
CPA	células presentadoras de antígenos, del inglés <i>antigen presenting cells o APCs</i>
CPH	complejo principal de histocompatibilidad
CTLA4	gen del <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CXCL13	gen del <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 13</i>
CXCR3	gen del <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 3</i>
DM1/DMID	diabetes mellitus tipo 1
DPM	dermato-polimiositis
EA	enfermedad de Addison
EAI	enfermedad autoinmune

EAMG	modelo experimental de MG autoinmune
EFNS	<i>European Federation of Neurological Societies</i>
EM	esclerosis múltiple
ENOX1	gen del <i>Ecto-NOX Disulfide-Thiol Exchanger 1</i>
EOMG	miastenia gravis de debut temprano, del inglés <i>early onset myasthenia gravis</i>
ER	estimulación nerviosa repetitiva
FAMG	formas familiares de MG autoinmune
FOXP3	factor de transcripción <i>Forkhead box P3</i>
FRET	sistema de fluorescencia FRET, del inglés <i>fluorescent resonance energy transfer</i>
GWAS	estudio de asociación del genoma completo, del inglés, <i>Genome-wide association study</i>
HLA	antígenos leucocitarios humanos, del inglés <i>Human Leukocyte Antigens</i>
IASLC	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
IFN-γ	interferon gamma
IMGT	<i>International ImMunoGeneTics project</i>
IOT	intubación orotraqueal
IPD	<i>Immuno Polymorphysm Database</i>
ITMIG	<i>International Thymic Malignancies Interest Group</i>
IVIg	inmunoglobulinas administradas por vía endovenosa
KASPar	<i>Kompetitive Allele Specific PCR</i>
LB	linfocito B
LD	desequilibrio de ligamento, del inglés <i>linkage disequilibrium</i>
LES	lupus eritematoso sistémico
LOMG	miastenia gravis de debut tardío, del inglés <i>late onset myasthenia gravis</i>

LRP4	<i>low-density Lipoprotein Receptor–Related Protein 4</i>
LT	linfocito T
Ltreg	linfocito T regulador
MG-ADL	<i>Myasthenia Gravis Activities of Daily Living profile</i>
MG-QoL15	<i>Myasthenia Gravis Quality of Life 15</i>
MG	Miastenia Gravis
MGC	<i>Myasthenia Gravis Composite Scale</i>
MGFA	<i>Myasthenia Gravis Foundation of America</i>
MHC	mayor histocompatibilidad complex
MMo	Micofenolato Mofetilo
MTc	corrección por test múltiples, del inglés <i>multiple test comparisons</i>
MuSK	quinasa musculoespecifica, del inglés <i>muscle human-specific kinase</i>
NAD(P)H	gen de la quinona oxidoreductasa
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NK	<i>natural killer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	gastrostomía endoscópica percutánea, del inglés <i>Percutaneous Endoscopic Gastrostomy</i>
PIS	<i>Myasthenia Gravis Post Interventional Status</i>
PLEX	Plasmaféresis
PR	Prednisona
PTPN22	gen de la <i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22</i>
QMG	<i>Quantitative Myasthenia Gravis score</i>

RA	artritis reumatoide, del inglés <i>rheumatoid arthritis</i>
RYR3	gen del receptor de rianodina 3
SAMG	formas esporádicas de MG autoinmune
SDF-1	gen del <i>Stromal Cell-derived Factor-1</i>
SFEMG	electromiografía de fibra simple, del inglés <i>Single Fiber Electromyography</i>
SLAMF1	gen de <i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 1</i>
SNP	polimorfismo de un solo nucleótido, del inglés <i>single nucleotide polymorphism</i>
TLR	receptor toll-like, del inglés <i>toll-like receptor</i>
UCI	unidad de cuidados intensivos
VGKC	canal de potasio voltaje dependiente Kv1.4
VLOMG	miastenia gravis de debut muy tardío, del inglés <i>very late onset myasthenia gravis</i>
VMI	ventilación mecánica invasiva
α-BuTx	alfa-bungarotoxina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Definición de miastenia gravis	19
1.2. Breve historia de la miastenia gravis	19
1.3. Epidemiología	20
1.4. Diagnóstico	21
1.4.1. Características clínicas	21
1.4.1.1. Formas de presentación	22
1.4.1.2. Evaluación y clasificación clínica de MG	22
1.4.1.3. Clasificación según la edad de inicio de los síntomas.....	25
1.4.2. Caracterización serológica	26
1.4.3. Test de edrofonio	28
1.4.4. Estudios neurofisiológicos.....	28
1.4.4.1. Estudio de fibra simple (SFEMG)	28
1.4.4.2. Estudio de estimulación nerviosa repetitiva (ER)	29
1.4.5. Otras pruebas complementarias	29
1.5. Enfermedades autoinmunes asociadas a MG.....	34
1.6. Tratamiento.....	34
1.6.1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa	35
1.6.2. Inmunosupresores e inmunomoduladores.....	35
1.6.3. Indicaciones y uso de las inmunoglobulinas y la plasmaféresis	37
1.6.4. Timectomía.....	38
1.7. Etiopatogenia de la miastenia gravis autoinmune	39
1.7.1. Influencia de los factores genéticos en MG autoinmune.....	39
1.7.2. Síndromes miasténicos congénitos: como diferenciarlos de las formas de MG autoinmune.....	40
1.7.3. Bases de la inmunidad humoral y celular en MG.....	41
1.7.4. El complejo principal de histocompatibilidad (CPH o MHC) y los antígenos leucocitarios humanos (HLA): características principales	43
1.7.5. Relación entre el HLA y las enfermedades autoinmunes	48
1.7.6. Técnicas serológicas y moleculares de tipificación HLA.....	48
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
2.1. Hipótesis	53
2.2. Objetivo principal	53
2.3. Objetivos secundarios	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1. Sujetos en estudio	57
3.1.1. Recogida de datos clínicos	58
3.1.2. Definición de casos y controles.....	58
3.2. Diseño de los estudios.....	59
3.2.1. Estudio de prevalencia de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española	59
3.2.2. Estudio caso-control en miastenia gravis autoinmune familiar (FAMG).....	59
3.2.3. Estudio caso-control en miastenia gravis autoinmune esporádica (SAMG)	60
3.2.4. Estudio de prevalencia de mutaciones en el gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG.....	60

3.2.5. Estudio caso-control para el análisis de variantes genéticas del gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG	61
3.3. Análisis estadísticos en FAMG, SAMG y controles	61
3.3.1. Análisis comparativo de los grupos FAMG, SAMG y control	61
3.3.2. Análisis HLA en formas esporádicas de MG (SAMG).....	62
3.3.3. Análisis mutacional del gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG	62
3.4. Extracción de ADN	63
3.4.1. Protocolo de extracción de ADN mediante salting out.....	63
3.4.2. Protocolo de extracción de ADN mediante kit comercial Qiagen.....	65
3.5. Análisis del genotipo HLA.....	66
3.5.1. Análisis HLA en formas familiares de MG (FAMG).....	66
3.5.1.1. Genotipado de alta resolución de HLA-DRB1 y -DQB1	66
3.5.1.2. Genotipado de alta resolución de HLA mediante secuenciación NGS....	67
3.6. Análisis del genotipo ENOX1.....	67
3.6.1. Análisis del gen ENOX1 por secuenciación Sanger	67
3.6.2. Análisis del gen ENOX1 por genotipado KASPar	69
4. RESULTADOS	73
4.1. Estudio de prevalencia de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española	73
4.2. Estudio del rol de los alelos HLA-DRB1 y DQB1 en las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española	76
4.2.1. Caracterización clínica	76
4.2.2. Resultados del genotipado de alta resolución de HLA-DRB1 y DQB1	76
4.2.3. Análisis comparativo de los grupos FAMG, SAMG y control	76
4.3. Estudio de alelos y haplotipos HLA en una población española de miastenia gravis autoinmune esporádica.....	83
4.3.1. Análisis caso-control	84
4.3.2. Análisis por grupos fenotípicos de MG.....	85
4.3.2.1. Según la edad debut de la MG	85
4.3.2.2. Según la forma de presentación y la clasificación funcional MGFA.....	86
4.3.2.3. Según el fenotipo serológico	86
4.3.2.4. Según el fenotipo anatomopatológico del timo.....	86
4.3.2.5. Análisis de variables fenotípicas combinadas: según la edad de debut de la MG, el fenotipo serológico y el fenotipo anatomopatológico del timo	86
4.4. Estudio del gen ENOX1 como potencial factor de riesgo para las formas familiares de miastenia gravis en una cohorte española.....	90
4.4.1. Estudio mutacional del gen ENOX1: variante c.*35A>G e identificación de nuevas variantes	90
4.4.2. Estudio de asociación genética de variantes del gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG: resultados del análisis de variantes mediante KASPar.....	91
4.4.2.1. Análisis de marcadores simples	91
4.4.2.2. Análisis por haplotipos.....	95
5. DISCUSIÓN.....	99
5.1. Estudio de prevalencia de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española	99

5.2. Estudio del rol de los alelos HLA-DRB1 y DQB1 en las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española	103
5.2.1. Análisis HLA en FAMG.....	103
5.2.2. HLA-DRB1 y HLA-DQB1 como factores de riesgo para FAMG.....	104
5.2.3. HLA-DRB1 y DQB1 como factores modificantes de fenotipo en FAMG	105
5.3. Estudio de alelos y haplotipos HLA en una población española de miastenia gravis autoinmune esporádica.....	106
5.4. Estudio del gen ENOX1 como potencial factor de riesgo para las formas familiares de miastenia gravis en una cohorte española.....	110
5.4.1. ENOX1 c.*35A>G como factor modificante de fenotipo en FAMG	110
5.4.2. Nuevas variantes (SNPs) en la región 3'UTR de ENOX1	111
5.4.3. Estudio de asociación genética de variantes del gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG mediante KASPar.....	111
5.5. Discusión conjunta.....	114
6. CONCLUSIONES	125
7. LÍNEAS DE FUTURO	129
8. BIBLIOGRAFÍA.....	133
 ANEXO 1: Artículo publicado: “Study of the prevalence of familial autoimmune myasthenia gravis in a Spanish cohort”	 149
 ANEXO 2: Resultados del estudio “Estudio de alelos y haplotipos HLA en una población española de miastenia gravis autoinmune esporádica”	 161

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune	75
Tabla 2. Características demográficas, clínicas y distribución HLA-DRB1/DQ1 de las formas familiares de MG autoinmune.....	78
Tabla 3. Características demográficas y clínicas de las formas familiares (FAMG) y esporádicas (SAMG) de miastenia gravis autoinmune y controles sanos en el estudio de los alelos HLA DR/DQB1	79
Tabla 4A. Frecuencias alélicas HLA-DRB1 en FAMG, SAMG y controles y resultados de los análisis comparativos	80
Tabla 4B. Frecuencias alélicas HLA-DRB1 en FAMG, SAMG y controles y resultados de los análisis comparativos (continuación).....	81
Tabla 5. Frecuencias alélicas HLA-DQB1 en FAMG, SAMG y controles y resultados de los análisis comparativos	82
Tabla 6. Datos demográficos y variables principales de estudio	83
Tabla 7. Demografía del estudio en pacientes MG con timoma y sin timoma.....	84
Tabla 8. Resultados del análisis caso-control comparando las frecuencias de los alelos y haplotipos HLA entre: 1. Casos de SAMG vs controles y 2. Casos de mujeres (Ca_M) SAMG vs mujeres controles sanos (Co_M).....	87
Tabla 9. Resultados del análisis caso-control, comparando las frecuencias de alelos y haplotipos HLA entre los casos MG de debut temprano (EOMG) versus la suma de los casos de debut tardío y muy tardío (LO+VLOMG)	88
Tabla 10. Resultados del análisis caso-control, comparando las frecuencias de los alelos y haplotipos HLA entre el grupo de mujeres con MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica (HPL) y anti-AChR positivos vs el resto de casos de MG	89
Tabla 11. Resultados del análisis de marcadores simples de ENOX1 para la edad de inicio de los síntomas de MG bajo los 5 modelos de herencia analizados.....	92
Tabla 12A. Resultados del análisis de marcadores simples del gen ENOX1 para las diferentes variables estudiadas	93
Tabla 12B. Resultados del análisis de marcadores simples del gen ENOX1 para las diferentes variables estudiadas	94
Tabla 13. Haplotipos inferidos de la población de casos MG y controles y su frecuencia poblacional.....	95

Tabla 14. Análisis de los haplotipos de ENOX1 para la edad de inicio de los síntomas de MG bajo los 3 modelos de herencia analizados.....	95
Tabla 15. Análisis de los haplotipos de ENOX1 para la presencia de timoma asociado a MG bajo los 3 modelos de herencia analizados.....	96
Tabla 16. Resumen de los principales estudios publicados en MG autoinmune y alelos o haplotipos HLA de riesgo.....	117
Tabla A1. Comparación interna del grupo control según el género.....	163
Tabla A2. Comparación de casos MG y controles según el género (hombres).	163
Tabla A3. Comparación de los casos MG y controles por grupos de edades.	164
Tabla A4. Comparación de los casos MG de debut tardío (LO) o muy tardío (VLO) según su género.....	164
Tabla A5. Comparación de los casos MG con debut ocular (MGFA I) contra el resto de MG (MGFA II-V).	165
Tabla A6. Comparación de los casos de MG+timoma contra el resto de casos de MG timectomizados.....	165
Tabla A7. Comparación de los casos de MG+hiperplasia tímica contra los casos MG timectomizados y resultados de anatomía patológica del timo normal o atrofia.	166
Tabla A8. Comparación de los casos de MG+ timoma contra los casos de MG+hiperplasia tímica... 166	
Tabla A9. Comparación de los casos de MG+hiperplasia tímica contra el resto de casos MG timectomizados.....	167
Tabla A10. Comparación de los casos de MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el resto de casos de EOMG.....	168
Tabla A11. Comparación de los casos de mujeres MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el resto de casos de EOMG.....	168
Tabla A12. Comparación de los casos de mujeres MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el resto de casos de mujeres EOMG.....	169
Tabla A13. Comparación de los casos de mujeres MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el resto de casos de mujeres MG (excepto EOMG y/o hiperplasia tímica).....	169
Tabla A14. Comparación de los casos de mujeres MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el subgrupo de casos totales de MG de debut tardío y muy tardío (LO+VLOMG)..	170

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de miastenia gravis

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad crónica autoinmune que se produce debido a una alteración de la transmisión neuromuscular. Esta alteración responde a la formación de anticuerpos específicos que se unen a proteínas de señalización, especialmente, el receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) situado en la membrana post-sináptica de la unión neuromuscular [Lennon 1978] (figura 1).

Etimológicamente, el término miastenia proviene del griego: “mys o myos”, que significa músculo y “astenia”, de “a-(sin)” y “sthenos” (fuerza), que traduciría fatiga, cansancio, debilidad. Y “gravis”, del latín, grave, aunque actualmente conocemos casos leves, en los que el uso de este término no sería adecuado.

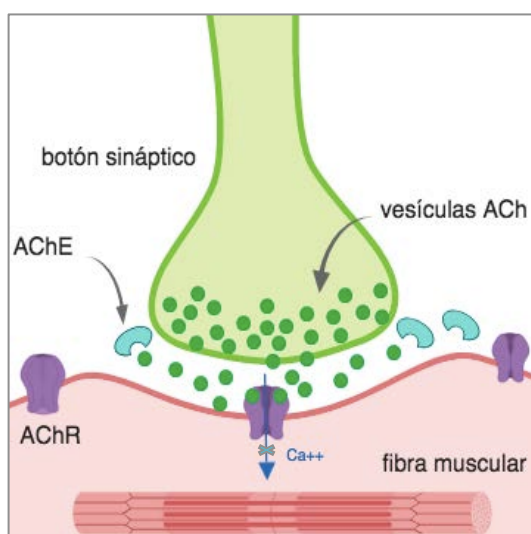


Figura 1. Representación esquemática de la placa neuromuscular en miastenia gravis autoinmune.

1.2. Breve historia de la miastenia gravis

La primera descripción de la enfermedad la realizó Thomas Willis, médico y anatomista, que en 1672 la incluyó en su obra “*De anima brutorum quae hominis vitalis ac sensitiva est*”, en la que también desarrolló e ilustró el famoso polígono de Willis de la circulación cerebral, entre muchos otros aspectos anatómicos, fisiológicos y patológicos, que siguen siendo estudiados en la actualidad por los estudiantes de medicina en todo el mundo [Hughes 2005, Alkhawajah 2013].

No fue hasta 1893, que Samuel Godflam, de origen polonés, pero formado en Berlín con Westphal y en Francia con Charcot, publicó su trabajo donde describía detalladamente tres casos de miastenia gravis; aunque sería el alemán Jolly, en 1895, quién acuñaría el término de *myasthenia gravis pseudoparalytica* [Hughes 2005].

Las primeras timectomías se realizaron en Suiza (Sauerbach) a principios del siglo XX, y más adelante en Estados Unidos e Inglaterra le prosiguieron Blalock y Keynes.

Años después, en 1960, los estudios de Simpson pondrían las bases para la autoinmunidad como mecanismo patogénico en miastenia gravis [Simpson 1960]. Seguidamente, se descubrirían los anticuerpos frente al receptor de acetilcolina en la placa neuromuscular como agente ejecutor principal de la enfermedad a partir de los trabajos de Nastuk y col. y Patrick, Lindstrom y col. en el modelo experimental de MG autoinmune (EAMG) [Nastuk 1959, Simpson 1964, Goldstein 1971, Lennon 1975].

1.3. Epidemiología

La MG se considera una enfermedad rara o minoritaria, es decir, una enfermedad crónica, que requiere un enfoque y atención multidisciplinarios y con una prevalencia inferior a 1 caso por 2.000 habitantes y año en la comunidad [Eurordis website, <https://www.eurordis.org/about-rare-diseases>, último acceso en 12/06/2019].

La prevalencia e incidencia de MG son muy variables según la serie consultada. En una revisión sistemática que incluyó 55 estudios realizados entre 1950 y 2007, se estimó una tasa de incidencia combinada de 5.3 casos por millón habitantes y año, siendo la tasa de prevalencia combinada estimada de 77.7 casos por millón de habitantes [Carr 2010].

Tradicionalmente, su incidencia se consideraba bimodal, con un primer pico de aparición en la tercera década de la vida (20-30 años), afectando especialmente a mujeres, y un segundo pico a partir de la sexta década (50 años) con un predominio de varones [Meyer 2010]. No obstante, en las últimas décadas, se ha observado un aumento espectacular en la incidencia de MG en personas de edad más avanzada, siendo muy comunes los casos de enfermedad que debutan en mayores de 60-65 años [Somnier 1991, Aarli 1999, Aragonès 2003, Murai 2011, Maniaol 2012, Alkhawajah 2013, Massa 2019].

La MG es una enfermedad esporádica. Las formas familiares autoinmunes (FAMG) representan sólo entre un 3 y un 5% de los casos [Namba 1971, Marrie 2000] y deben diferenciarse de los denominados síndromes miasténicos congénitos.

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de MG es **clínico**. Se basa principalmente en la anamnesis y los signos clínicos sugestivos a la exploración neurológica. En pacientes con una elevada sospecha clínica, se recomienda la confirmación mediante al menos por alguno de los siguientes métodos:

- confirmación inmunológica, mediante la determinación de la positividad y los títulos de anticuerpos anti-AChR o anti-MuSK;
- confirmación electrofisiológica, mediante la alteración específica de las pruebas de estimulación nerviosa repetitiva (ER) y electromiografía de fibra simple (SFEMG) o
- confirmación farmacológica usando el test de Tensilon, o bien como alternativas el test del hielo o la administración de Piridostigmina oral.

1.4.1. Características clínicas

Los pacientes con miastenia gravis manifiestan fatiga precoz y debilidad que puede afectar parcial o globalmente a la musculatura esquelética. Estos síntomas suelen empeorar a lo largo del día, siendo de predominio vespertino y mejoran con el reposo o el sueño [Drachman 2016, Gilhus 2016]. La fluctuación clínica, es pues, otro de sus rasgos fundamentales, y consiste en la variación en la intensidad de estos síntomas en un mismo individuo en respuesta a características temporales, ambientales, factores estresantes internos u externos (estrés emocional, fiebre, infecciones, medicación concomitante, cirugía, entre otros) [Meriggioli 2009].

La fatigabilidad es el signo clínico más característico de miastenia gravis, aunque no es patognomónico de esta entidad. Se puede detectar en la exploración física mediante maniobras de provocación y consiste en la incapacidad del paciente de mantener un ejercicio prolongado por parte de los músculos voluntarios craneales o de las extremidades.

1.4.1.1. Formas de presentación

La distribución de la fatiga y la debilidad muscular es variable, pudiendo afectar sólo a la musculatura extraocular (**MG ocular**) o bien de forma generalizada (**MG generalizada**). Los síntomas oculares, en forma de diplopía y/o ptosis palpebral, son los más comunes y pueden ser la forma de debut de la enfermedad de forma aislada en aproximadamente un 85% de los pacientes. En los dos primeros años desde el primer síntoma, alrededor de un 50-60% de estos pacientes evolucionaran a una forma de MG generalizada. En el resto de casos, más de un 50% de los pacientes presentan un debut generalizado de intensidad y gravedad variables y algunos muestran formas de debut combinado ocular y bulbar u ocular y de extremidades [Meriggioli 2009].

Las formas de MG autoinmune asociadas a la presencia de anticuerpos anti-MuSK poseen una serie de características muy concretas. Representan aproximadamente un 5-8% del total de pacientes con MG [Evoli 2018] y un 40% de las formas generalizadas AChR-negativas [Sieb 2014]. Los casos suelen tener un debut temprano, con un claro predominio en mujeres, alrededor de los 30 años de edad y se caracterizan por una afectación selectiva de la musculatura facial, cervical, bulbar y respiratoria. Estos pacientes pueden mostrar atrofia facial y lingual en resonancia magnética [Sieb 2014, Evoli 2018, Gilhus 2016]. En cambio, la musculatura extraocular suele estar más respetada en estos casos. Las crisis miasténicas son más frecuentes en estos pacientes, que presentan intolerancia a los fármacos anticolinesterásicos [Sieb 2014]. La timectomía no está indicada en este fenotipo clínico concreto, ya que el timo no suele mostrar alteraciones [Meriggioli 2009].

1.4.1.2. Evaluación y clasificación clínica de MG

El grado de fatigabilidad y debilidad se cuantifica con escalas de evaluación clínica estandarizadas que permitan objetivar la situación de la enfermedad en cada paciente al inicio y compararlo con futuras exploraciones para conocer de forma indirecta la respuesta al tratamiento.

La escala cuantitativa denominada **Quantitative Myasthenia Gravis (QMG)**, de la Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) consta de 13 ítems que se miden en una escala de 0 a 3 puntos (puntuación total de 0-39 puntos) y que evalúan los músculos extraoculares, axiales, bulbares y de extremidades, así como la capacidad vital forzada (FVC) y la dinamometría manual [Bahron 1998].

La escala de calidad de vida **Myasthenia Gravis Activities of Daily Living profile (MG-ADL)** consiste en una encuesta sencilla de 8 preguntas sobre los síntomas de miastenia gravis, de fácil administración, que puede ser utilizada como variable de eficacia secundaria en ensayos clínicos [Wolfe 1999].

La **Myasthenia Gravis Composite Scale (MGC)** se compone de 10 ítems, que administra el profesional al paciente para valorar funciones de musculatura axial, bulbar y de extremidades obteniendo una puntuación que oscila desde los 0 a 50 puntos. Su uso está validado para la práctica clínica habitual y para ensayos clínicos en MG [Burns 2010].

El cuestionario **Myasthenia Gravis Quality of Life 15 (MG-QoL15)** consiste en un test que, a diferencia de los anteriores, es autoadministrado por el paciente en la consulta. En este cuestionario de 15 ítems se le pregunta sobre la influencia de la MG en su estado de ánimo, así como en algunas de sus actividades cotidianas más representativas, como salir a la calle, mantener relaciones sociales, conducir, leer, entre otras [Burns 2011].

La **clasificación de la Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA)** (figura 2) permite estratificar a los pacientes en subgrupos según su situación clínica. Se trata de una categorización internacionalmente aceptada y empleada en ensayos clínicos multicéntricos en MG. Posee un carácter dinámico, es decir, variable en función de la distribución, la intensidad y la gravedad de los síntomas de MG en un determinado paciente, en un momento concreto [Jaretzki 2000].

CLASIFICACIÓN MGFA

Clase I: OCULAR

Clase II: LEVE OCULAR y GENERALIZADA

Clase III: MODERADA OCULAR y GENERALIZADA

Clase IV: GRAVE OCULAR y GENERALIZADA (incluida PEG sin IOT)

Clase V: INTUBACIÓN OROTRAQUEAL +/- VMI (excepto post-operatorio)

**** Clases II, III, IV:**

- **Ila/IIla/IVa.** Afectación predominante de **extremidades, musculatura axial** o ambas +/- afectación menos intensa de musculatura orofaríngea.
- **Ilb/IIlb/IVb.** Afectación predominante **orofaríngea, respiratoria** o ambas +/- afectación menos intensa de musculatura de extremidades, musculatura axial o ambas.

Figura 2. Clasificación Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA). PEG: gastrostomía endoscópica percutánea. IOT: intubación orotraqueal. VMI: ventilación mecánica invasiva.

La evaluación estandarizada del estado postintervención, es decir, la respuesta clínica que muestra el paciente después de haberse introducido un nuevo tratamiento farmacológico o de haberse modificado la pauta de tratamiento para MG, se realizará mediante la **escala Myasthenia Gravis Post Interventional Status (PIS)** (figura 3). Mientras que la **escala MGFA MG therapy status** (figura 4) se utilizará para establecer la pauta de tratamiento de cada individuo en el momento de su evaluación [Jaretzki 2000].

MGFA Post-intervention Status (MGFA-PIS)	
Complete Stable Remission (CSR)	The patient has had no symptoms or signs of MG for at least 1 year and has received no therapy for MG during that time. There is no weakness of any muscle on careful examination by someone skilled in the evaluation of neuromuscular disease. Isolated weakness of eyelid closure is accepted.
Pharmacologic Remission (PR)	The same criteria as for CSR except that the patient continues to take some form of therapy for MG. Patients taking cholinesterase inhibitors are excluded from this category because their use suggests the presence of weakness.
Minimal Manifestations (MM)	The patient has no symptoms of functional limitations from MG but has some weakness on examination of some muscles. This class recognizes that some patients who otherwise meet the definition of CSR or PR do have weakness that is only detectable by careful examination.
MM-0	The patient has received no MG treatment for at least 1 year.
MM-1	The patient continues to receive some form of immunosuppression but no cholinesterase inhibitors or other symptomatic therapy.
MM-2	The patient has received only low-dose cholinesterase inhibitors (<120 mg pyridostigmine/day) for at least 1 year.
MM-3	The patient has received cholinesterase inhibitors or other symptomatic therapy and some form of immunosuppression during the past year.
Change in Status Improved (I)	A substantial decrease in pretreatment clinical manifestations or a sustained substantial reduction in MG medications as defined in the protocol. In prospective studies, this should be defined as a specific decrease in QMG score.
Unchanged (U)	No substantial change in pretreatment clinical manifestations or reduction in MG medications as defined in the protocol. In prospective studies, this should be defined in terms of a maximum change in QMG score.
Worse (W)	A substantial increase in pretreatment clinical manifestations or a substantial increase in MG medications as defined in the protocol. In prospective studies, this should be defined as a specific increase in QMG score.
Exacerbation (E)	Patients who have fulfilled criteria of CSR, PR, or MM but subsequently developed clinical findings greater than permitted by these criteria.
Died of MG (D of MG)	Patients who died of MG, of complications of MG therapy, or within 30 days after thymectomy. List the cause (see Morbidity and Mortality table).

Figura 3. Clasificación MGFA-PIS, extraída de la página web oficial de la MGFA; último acceso 5 Junio 2019 (<https://myasthenia.org/For-Professionals/Resources-for-Professionals>).

MGFA MG Therapy Status	
NT	No therapy
SPT	Status post-thymectomy (record type of resection)
CH	Cholinesterase inhibitors
PR	Prednisone
IM	Immunosuppression therapy other than prednisone (define)
PE(a)	Plasma exchange therapy, acute (for exacerbations or preoperatively)
PE(c)	Plasma exchange therapy, chronic (used on a regular basis)
IG(a)	IVIg therapy, acute (for exacerbations or preoperatively)
IG(c)	IVIg therapy, chronic (used on a regular basis)
OT	Other forms of therapy (define)

Figura 4. Escala MGFA MG therapy status, extraída de la página web oficial de la MGFA; último acceso 5 Junio 2019 (<https://myasthenia.org/For-Professionals/Resources-for-Professionals>).

1.4.1.3. Clasificación según la edad de inicio de los síntomas

De forma general, se acepta que los pacientes con miastenia gravis y debut temprano (EOMG, del inglés *early onset myasthenia gravis*), inician los síntomas de la enfermedad antes de los 40 años [Compston 1980, Saruhan 2006, Meriggioli 2009, Maniaol 2012], aunque algunos autores sitúan el debut de estas formas hasta los 50 años [Murai 2011, Berrih-Aknin 2014, Akaishi 2014]. El fenotipo EOMG es más frecuente en mujeres (3:1) y se asocia a la presencia de hiperplasia tímica.

Las formas de debut en la infancia o la adolescencia, denominadas **MG juvenil**, representan sólo un 10-15% de los casos en Europa y EUA, pero son muy comunes en Asia, afectando un 50% de los pacientes menores de 15 años y con formas puramente oculares en la mayoría de los casos [Meriggioli 2009].

En cambio, las formas de debut tardío (LOMG, del inglés *late onset myasthenia gravis*), se inician por encima de los 41-50 años [Compston 1980, Aarli 1999, Aarli 2008, Somnier 1999, Saruhan 2006, Meriggioli 2009, Murai 2011, Berrih-Aknin 2014, Akaishi 2014], afectando de forma predominante a hombres, siendo más habitual la presencia de timoma y títulos de anti-AChR más bajos. Por el contrario, en algunas series de pacientes se describe un claro predominio de las formas oculares con seropositividad para anti-AchR [Zivkovic 2012].

En individuos mayores de 60-65 años, el debut de la MG se considera muy tardío (VLOMG, del inglés, *very late onset myasthenia gravis*). En estos casos, podemos observar más frecuentemente asociación a timoma y a la presencia de anticuerpos anti-titina y anti-rianodina [Yamamoto 2001]. Además, cabe tener en cuenta la necesidad de ajustar la pauta de tratamiento según la función renal, la presencia de comorbilidades y la mayor probabilidad de complicaciones como la hiperglucemia, la diabetes, el riesgo de fractura o la osteoporosis, la hipertensión arterial, entre otros [Aarli 1999, Alkhawajah 2013, Aragonès 2003, Zivkovic 2012].

La **miastenia gravis neonatal** consiste en una alteración transitoria y autolimitada de los síntomas de MG debido al paso de los anticuerpos maternos al feto a través de la barrera placentaria (IgG). Ocurre en aproximadamente un 10-15% de recién nacidos hijos de madres afectas. Se manifiesta generalmente en el momento del parto o en las horas sucesivas, en forma de debilidad generalizada, succión y llanto débiles, entre otros y se resuelve espontáneamente en pocos días o semanas. En casos más raros, se puede desarrollar un síndrome de artrogriposis múltiple si los anticuerpos van dirigidos contra los AchR fetales [Vincent 2001, Meriggioli 2009].

1.4.2. Caracterización serológica

Los **anticuerpos contra el receptor nicotínico de acetilcolina** (anti-AChR) están presentes en aproximadamente 80-85% de pacientes con miastenia gravis [Lindstrom 1998, Berrih-Aknin 2014, Conti-Fine 2006]. En pacientes sin anticuerpos anti-AChR (denominados seronegativos), los **anticuerpos contra la quinasa musculoespecífica** (del inglés *human-specific kinase o anti-MuSK*) se encuentran en aproximadamente un 4-40% de casos [Meriggioli 2009, Sieb 2014, Berrih-Aknin 2014]. Aunque los anti-AChR se miden por técnicas de radioinmunoensayo usando alfa-bungarotoxina (α -BuTx) de forma estandarizada en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico [Lindstrom 1977, Appel 1975], en un estudio donde se emplearon técnicas basadas en cultivos celulares, un 66% de individuos seronegativos para anti-AChR poseían anticuerpos de baja afinidad contra este receptor (del inglés *low-affinity anti-AChR antibodies*) [Leite 2008].

Recientemente, se han descrito, en pacientes seronegativos, los **anticuerpos contra LRP4** (del inglés *low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein 4*) [Higuchi 2011, Pevzner 2012, Zhang 2012], presentes en un 10-20% de los pacientes doblemente seronegativos (anti-AChR y anti-MuSK negativos) [Berrih-Aknin 2014, Yan 2018]. El resto de pacientes con MG siguen siendo considerados seronegativos [Sieb 2014].

En algunos pacientes con MG, se pueden detectar anticuerpos contra las proteínas del músculo estriado (del inglés *ASMA*s o *anti-striated muscle antibodies*) que incluyen, los anticuerpos **anti-titina** [ATA, que se encuentran en el 50% de pacientes con timoma]; los **anticuerpos contra el receptor de la rianodina** [*anti-ryanodine receptor (RyR)*]; más frecuentes en pacientes con inicio tardío (*late-onset myasthenia gravis* o *LOMG*) con o sin timoma] o los anti-alfa-actinina, miosina y conectina [Yamamoto 2001]. Los **anticuerpos anti-agrina** se han descrito tanto en pacientes con anti-AChR positivos como en seronegativos para anti-AChR o pacientes doble o triplemente seronegativos (AChR-/MuSK-/LRP-4-) [Oger 2015, Yan 2018].

La presencia de anticuerpos contra los canales de potasio voltaje dependiente Kv1.4 (VGKC), ATA y anti-rianodina es común en pacientes con miastenia de debut tardío, asociada a timoma y miocardiopatía [Nacu 2015].

Los anticuerpos contra la proteína cortactina han sido detectados en pacientes con MG, pero también en pacientes con otras enfermedades autoinmunes como el síndrome de Lambert-Eaton, la artritis reumatoide, el lupus o la poliradiculoneuropatía inflamatoria crónica desmielinizante (CIDP), entre otros [Gallardo 2014].

En la actualidad, en la práctica clínica habitual, para el diagnóstico de MG, se realiza la determinación de anticuerpos anti-AChR y anti-MuSK. El resto de determinaciones serológicas descritas se emplean únicamente con finalidad investigadora (figura 5).

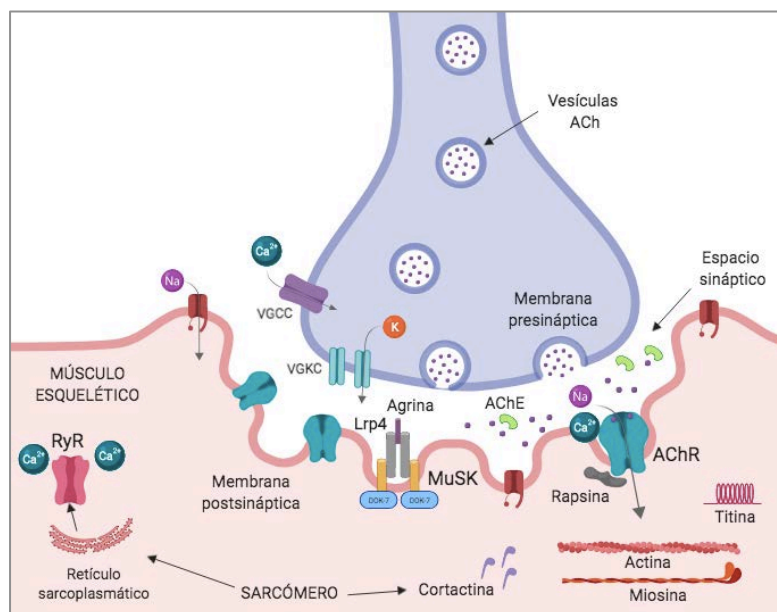


Figura 5. Representación esquemática de las principales proteínas, receptores y componentes de la placa neuromuscular relacionados con la MG.

1.4.3. Test de edrofonio

El test de edrofonio (Tensilon® o Anticude®) se realiza administrando inicialmente 1-2 mg de este fármaco por vía endovenosa al paciente con síntomas miasténicos para descartar la hipersensibilidad al fármaco. Seguidamente, se administraran 6-8 mg adicionales, para comprobar una mejoría espectacular de la debilidad muscular en un tiempo muy breve. El inicio del efecto se suele observar a los 30 segundos y tiene una duración máxima de unos 5-10 minutos [Osserman 1952].

Se trata de un análogo de los anticolinesterásicos como la Neostigmina o la Piridostigmina con acción anti-curare. Por sus potenciales efectos adversos colinérgicos a través de la estimulación de receptores muscarínicos, se recomienda realizar este test únicamente en el ámbito de un servicio de urgencias hospitalario o en unidades de cuidados intensivos, con el paciente siempre monitorizado y con un acceso venoso periférico ante la posibilidad de que requiera una dosis de rescate de atropina en caso de aparición de dicha reacción sistémica [Drachman 2016].

Además de sus potenciales riesgos, el test de edrofonio no es específico de la miastenia gravis, pudiendo ser positivo en pacientes con otros síndromes miasteniformes como el síndrome de Lambert-Eaton, algunos síndromes miasténicos congénitos (CMS), el botulismo, el síndrome de Guillain-Barré-Sthrol o en enfermedades de motoneurona y mitocondriales [Oh SJ 1990].

El test del hielo (del inglés, *ice-pack-test*) consiste en colocar un paquete de hielo sobre los párpados del paciente, comprobando la resolución de la ptosis en unos minutos [Drachman 2016].

1.4.4. Estudios neurofisiológicos

Para la confirmación neurofisiológica de un patrón de alteración en la transmisión post-sináptica a nivel de la placa neuromuscular, se utilizan dos pruebas neurofisiológicas concretas: el estudio de fibra simple (SFEMG) y la estimulación nerviosa repetitiva (ER). Previamente, debería realizarse siempre un estudio de conducción nerviosa y electromiografía convencionales [Howard 1994].

1.4.4.1. Estudio de fibra simple (SFEMG)

La electromiografía de fibra aislada, del inglés *single fiber electromyography* (SFEMG) consiste en el registro de dos potenciales de acción de fibra muscular de una misma unidad

motora. Para registrarlos, se utiliza un electrodo especial con una superficie de registro de 25 micrómetros (diámetro).

Es el test neurofisiológico más sensible para el diagnóstico de MG [Conti-Fine 2006, Howard 1994]. Está basado en la existencia de una alteración del factor de seguridad de la placa neuromuscular en pacientes con MG. La pérdida de receptores de acetilcolina funcionales en la placa dan lugar a una disminución de amplitud de los potenciales motores, evitando que éstos superen el umbral necesario para la despolarización de la membrana y alterando así la transmisión neuromuscular [Sanders 1996, Meriggioli 2009].

En una persona sana, existe siempre una cierta variabilidad en cuanto a la cantidad de acetilcolina liberada en la placa neuromuscular en cada contracción, motivo por el cual, siempre se observará cierta variabilidad interpotencial.

En cambio, cuando existe una alteración de la transmisión en la placa neuromuscular, esta variabilidad excede un tiempo determinado (40 microsegundos) y se observa una fluctuación del potencial denominada *jitter*, que traduce la superación del factor de seguridad de la transmisión neuromuscular. Habitualmente, se recoge una serie de 20 registros de fibras con unas 100 descargas por registro y si el *jitter* está aumentado en más de 2 de estos registros (10% de los pares estudiados) se considera un resultado patológico (figura 6).

1.4.4.2. Estudio de estimulación nerviosa repetitiva (ER)

La estimulación repetitiva a bajas frecuencias, de entre 3 y 5 Hz, producirán un decremento del potencial de acción muscular entre el cuarto y quinto estímulos en pacientes con MG. Un decremento de más de un 10% se considera patológico (figura 7).

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa pueden alterar la respuesta y enmascarar el resultado, hecho por el cual su administración debe suspenderse al menos 6 horas antes de realizar el test. También es importante señalar la influencia de la correcta inmovilización del paciente y evitar los cambios de temperatura corporal durante la prueba.

1.4.5. Otras pruebas complementarias

La mayoría de pacientes con MG (80-90%) presentan alteraciones histológicas en la glándula tímica. Puede tratarse de una hiperplasia folicular (habitualmente en mujeres con debut temprano y anti-AChR positivos) o un de un tumor epitelial situado en mediastino

anterior, denominado timoma (10-15% de casos de MG) [Vincent 1979, Machens 1999, Gilhus 2011].

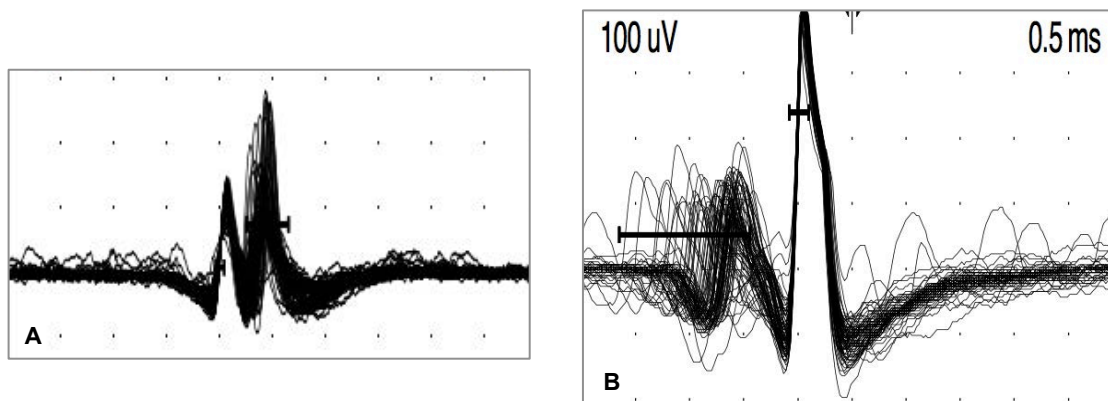


Figura 6. Ejemplo de estudio de fibra simple (SFEMG) patológico, compatible con defecto de transmisión post-sináptico de placa neuromuscular (MG). A. Registro SFEMG de músculo frontalis en paciente con miastenia generalizada de debut bulbar. B. Registro SFEMG de músculo extensor digitorum comunis totalmente alterado en paciente con miastenia generalizada.

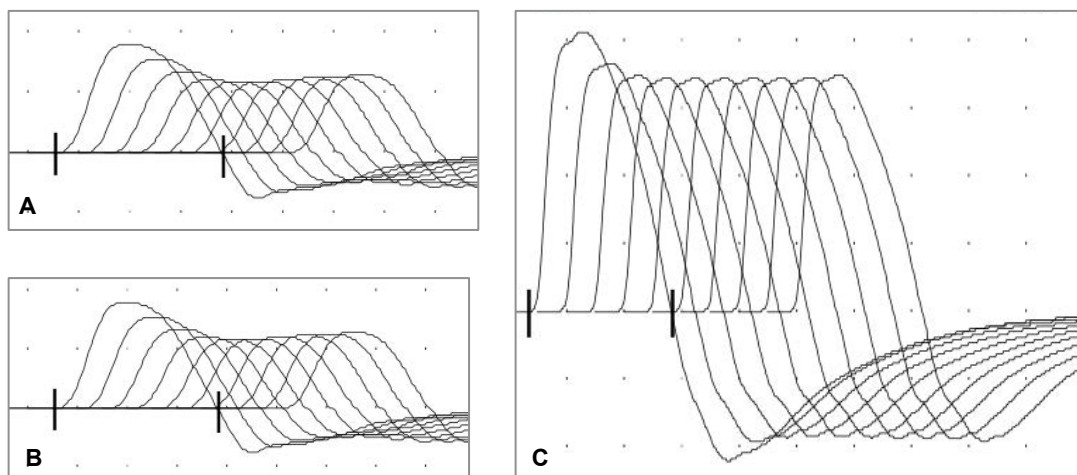


Figura 7. Ejemplo de registro del test de estimulación nerviosa repetitiva (ER) en una paciente con miastenia gravis autoinmune, donde se observa un decremento patológico de la amplitud del potencial de acción motor de forma generalizada. Se muestran los registros correspondientes a los músculos: A y B. abductor pollicis brevis. C. músculo espinal trapecio.

La incidencia de timoma es mayor en pacientes con MG de inicio tardío (LOMG), siendo más frecuentes las formas de debut bulbar y pudiendo tener un curso clínico más grave, con crisis más frecuentes. Su pronóstico suele ser similar al de los pacientes sin timoma con un tratamiento inmunomodulador adecuado [Kuks 2009].

Los pacientes con timoma asociado a MG pueden presentar recurrencias (mediastino, implantes pleurales) en un 10% de los casos [Vincent 2001]. La tipificación clínica, mediante pruebas de imagen y el estudio histopatológico, permite estratificar a los pacientes según el riesgo potencial de recurrencia y su pronóstico.

Las clasificaciones de Masaoka (figura 8A), Masaoka-Koga [Masaoka 2010, Detterbeck 2011] y TNM son las más utilizadas y aceptadas internacionalmente. Recientemente, la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) y el International Thymic Malignancies Interest Group (ITMIG) han propuesto una nueva modificación de estas clasificaciones [Liang 2016] (figura 8B).

A

Estadio I: Completamente encapsulado macroscópicamente y sin invasión capsular microscópica

Estadio II: 1. Invasión macroscópica del tejido adiposo circundante o la pleura mediastínica o
2. Invasión microscópica de la cápsula

Estadio III: Invasión macroscópica de alguno de los órganos adyacentes (ej. pericardio, grandes vasos o pulmón)

Estadio IVa: Diseminación pleural o pericárdica

Estadio IVb: Metástasis linfáticas o vasculares a órganos distantes (extratorácicos)

B

Table 9 The relationship between the IASLC/ITMIG TNM proposal staging categories and Masaoka-Koga staging system

The 8 th edition TNM stage	TNM	Definition (involvement of)	Masaoka-Koga
Stage I	T1aN0M0	Encapsulated or unencapsulated, with or without extension into mediastinal fat	Stage I and II
	T1bN0M0	Extension into mediastinal pleura	Stage III (partial-pleura)
Stage II	T2N0M0	Pericardium	Stage III (partial-pericardium)
Stage IIIa	T3N0M0	Lung, brachiocephalic vein, superior vena cava, chest wall, phrenic nerve, hilar (extrapericardial) pulmonary vessels	Stage III (partial-completeness of resection)
Stage IIIb	T4N0M0	Aorta, arch vessels, main pulmonary artery, myocardium, trachea, or esophagus	Stage III (partial-incompleteness of resection)
Stage IVa	TxN1M0	Anterior (perithymic) nodes	Stage IVb
	TxN0M1a	Separate pleural or pericardial nodule(s)	Stage IVa
	TxN1M1a	Anterior (perithymic) nodes, Separate pleural or pericardial nodule(s)	Stage IVb
Stage IVb	TxN2M0	Deep intrathoracic or cervical nodes	Stage IVb
	TxN2M1a	Deep intrathoracic or cervical nodes, Separate pleural or pericardial nodule(s)	Stage IVb
	TxNxM1b	Pulmonary intraparenchymal nodule or distant organ metastasis	Stage IVb

IASLC, the International Association for the Study of Lung Cancer; ITMIG, the International Thymic Malignancies Interest Group.

Figura 8A. Sistema de estadiaje del timoma de Masaoka. Adaptado de Masaoka A. J of Thorac Oncol. 2010 [Masaoka 2010]. **8B.** Comparación de las clasificaciones de Masaoka-Koga, TNM según la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) y el International Thymic Malignancies Interest Group (ITMIG). Adaptado de Liang G y col. J Thorac Dis 2016 [Liang 2016].

Desde el punto de vista histológico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece también una clasificación de los timomas que se muestra en la **figura 9**.

Tipo A	4-7% timomas, 17% asociados a MG, buen pronóstico, supervivencia ≥ 15 años células epiteliales de morfología oval o fusiforme y escasos linfocitos no neoplásicos
Tipo AB	28-34% timomas, 16% asociados a MG, buen pronóstico, supervivencia ≥ 15 años tipo A + focos ricos en linfocitos no neoplásicos
Tipo B1	células epiteliales de morfología epitelioides
Subtipo B1	9-20% timomas, 57% asociados a MG, buen pronóstico, supervivencia $\approx 90\%$ a 20 años células epiteliales de morfología epitelioides con apariencia indistinguible del córtex normal del timo con áreas medulares
Subtipo B2	20-36% timomas, 71% asociados a MG, supervivencia $\approx 60\%$ a 20 años células epiteliales de morfología epitelioides con algunas células redondeadas con núcleos vesiculares y abundantes linfocitos no neoplásicos
Subtipo B3	supervivencia $\approx 40\%$ a 20 años tumor epitelial, atípico, escamoide o carcinoma típico, bien diferenciado células epiteliales de morfología epitelioides redondeadas o poligonales \pm leve atípia y escasos linfocitos no neoplásicos

Figura 9. Clasificación histológica de los timomas (OMS). Adaptado de J Thorac Oncol. 2015 Oct; 10(10): 1383–1395 [Marx 2015] y la web de International Thymic Malignancies Interest Group (ITMIG) (<https://itmig.org>, último acceso 22 junio 2019).

En la siguiente figura presentamos dos casos de timectomía en pacientes con MG autoinmune, mediante la descripción detallada del estudio macróscopico e histológico (**figura 10**).

Los expertos recomiendan también la determinación de las hormonas tiroideas y/o los anticuerpos anti-tiroideos en pacientes con MG, puesto que, como se explicará en los siguientes apartados, las enfermedades tiroideas son los trastornos autoinmunes más comúnmente asociados a MG [Meriglioli 2009, Vincent 2001, Drachman 2016, Sieb 2014].

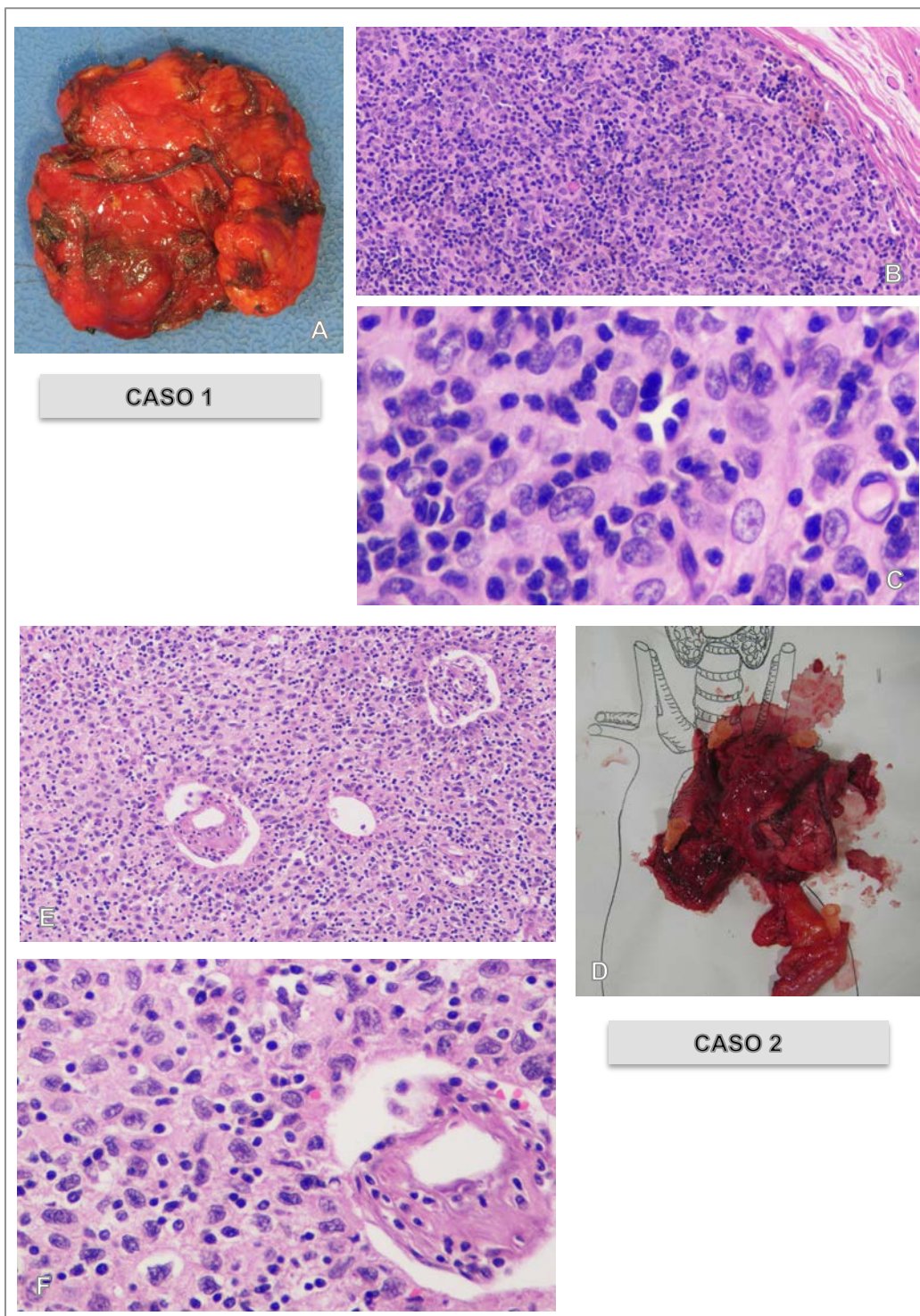


Figura 10. Piezas de timectomía en dos casos de MG autoinmune. **Caso 1.** **A.** imagen macroscópica que muestra fragmento de tejido adiposo de 5,5x4,4x0,9cm y 17,7g de peso. Al corte, parenquima tímico de coloración blanquecina con nódulo amarillento de 0,6 cm de diámetro, sin contacto con los márgenes de resección. **B y C.** Estudio histológico (100x y 400x respectivamente) que muestra componente epitelioides CD1a+ y componente linfoide CD3+CD5+ por tinción inmunohistoquímica (IHQ). Timoma Masaoka estadio I. **Caso 2.** **D.** Estudio macroscópico: masa mediastínica de 60g que incluye porción de timo de 8x5,5x3cm y adherido a este, pieza de resección atípica pulmonar de lóbulo superior izquierdo de 4,5x2,6cm. Al corte, tumoración sólida, nodular de aspecto encapsulado y coloración blanquecina. **E y F.** Estudio histológico (100x y 400x) e IHQ muestra células epitelioides con tinción CK19+ intensa y difusa, CD5+ débil y focal; linfocitos de fenotipo T inmaduros (CD5 y TdT) y aislados linfocitos B CD20+. Infiltración de pleura mediastínica, visceral y parénquima pulmonar. No hay signos de permeación linfovascular. Timoma atípico B3; estadio Masaoka modificado III.

1.5. Enfermedades autoinmunes asociadas a MG

Los pacientes con MG, como sucede en otras enfermedades autoinmunes, presentan un riesgo más elevado de desarrollar una segunda enfermedad autoinmune (EAI). La extensa serie de casos de MG revisada por Simpson en 1964 ponía en relevancia una elevada co-ocurrencia de otras EAI, especialmente trastornos tiroideos, anemia perniciosa y artritis reumatoide, así como la existencia de anticuerpos órgano-específicos en estos pacientes [Simpson 1964].

Algunos autores señalan una frecuencia de segunda EAI en pacientes miasténicos de entre un 10 y 22% [Gilhus 2011, Nacu 2015, Fang 2015], siendo las más frecuentes las enfermedades tiroideas, el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (RA), la dermato-polimiositis (DPM) y la enfermedad de Addison (EA) [Nacu 2015].

En las formas de debut temprano (EOMG), las enfermedades tiroideas autoinmunes, el LES y la diabetes mellitus tipo 1 (DM1), así como el Síndrome de Sjögren, la RA, la DPM y la EA son más comunes, mientras que en LOMG predomina la enfermedad de Hashimoto, el LES y la esclerosis múltiple (EM). Estas diferencias sugieren una relación directa con posibles factores genéticos de predisposición, como el haplotipo HLA B8-DR3, que también demostró actuar como factor de riesgo para LES, EA y DPM en MG [Fang 2015].

Una revisión sistemática de Mao y col. subrayó la existencia de una significativa heterogeneidad en el origen de los datos analizados en diversos estudios publicados previamente (procedentes de muestras poblacionales, hospitalarias o estudios retrospectivos de bases de datos hospitalarias). Los autores calcularon una frecuencia combinada de EAI co-ocurrente en MG de un 13%, con claro predominio de las enfermedades tiroideas autoinmunes y siendo especialmente frecuentes en mujeres con MG y en pacientes con anticuerpos positivos [Mao 2011].

1.6. Tratamiento

Hasta hace relativamente pocos años, el tratamiento de MG no se basaba en los resultados de ensayos clínicos ciegos y aleatorizados con un elevado nivel de evidencia científica, sino en los datos publicados en series de casos, estudios con poca evidencia, opiniones de expertos y la propia experiencia del profesional en el manejo terapéutico de MG [Gilhus 2011, Sieb 2014].

En la última década, se han publicado las guías de la European Federation of Neurological Societies (EFNS) para el tratamiento de MG y otros trastornos de la unión neuromuscular [Skeie 2010] y la MGFA Task Force ha establecido las bases para elaborar sus propias recomendaciones [Sanders 2018].

El tratamiento de la MG es complejo y requiere de la combinación de diversas estrategias que se detallan en los apartados siguientes incluyendo: el tratamiento sintomático; el tratamiento inmunosupresor; el tratamiento de las crisis miasténicas o las exacerbaciones de MG y la timentomía.

Es esencial la individualización de la pauta terapéutica para cada paciente, teniendo especialmente en cuenta las posibles comorbilidades en individuos de edad avanzada o con otras enfermedades asociadas.

1.6.1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa se emplean en el tratamiento sintomático del paciente con MG para facilitar una mayor presencia de acetilcolina libre en la placa y potenciar la transmisión neuromuscular [Skeie 2010, Gilhus 2011]. Las dosis habitualmente recomendadas de bromuro de piridostigmina son de 30-60 mg tres o cuatro veces al día por vía oral.

Como efectos adversos nicotínicos pueden aparecer calambres musculares y fasciculaciones, aunque sus principales complicaciones se relacionan con la activación de receptores muscarínicos que generan bradicardia, broncorrea, sialorrea, diaforesis, calambres abdominales y/o diarrea [Sieb 2014, Skeie 2010]. Por este motivo, no se recomienda su uso en fases iniciales de exacerbación aguda o crisis miasténica, ya que pueden dificultar la intubación orotraqueal y/o el manejo de las secreciones respiratorias. Su administración en pacientes MG-MuSK puede empeorar los síntomas de la enfermedad por hipersensibilidad.

1.6.2. Inmunosupresores e inmunomoduladores

Los corticoesteroides, como la Prednisona o la Metilprednisolona siguen siendo el inmunosupresor más eficaz para tratar la MG, a pesar de que no se han realizado ensayos clínicos controlados comparándolos con otros fármacos [Gilhus 2011].

Se recomienda su uso a dosis bajas o los regímenes terapéuticos a días alternos (10-20 mg cada 24 o 48 horas), con la finalidad de minimizar sus efectos secundarios o

reacciones paradójicas de empeoramiento transitorio de los síntomas, especialmente en pacientes de edad avanzada.

En situaciones agudas (empeoramiento de MG o crisis miasténica), se recomienda iniciar a dosis altas (40-60 mg/día) reforzando la monitorización y el tratamiento de soporte en unidades de urgencias o cuidados intensivos [Skeie 2010, Ponseti 2007].

La Azatioprina inhibe la síntesis de ADN y ARN en los leucocitos T y suele emplearse combinada con Prednisona o derivados, ya que permite reducir sus dosis totales. Aunque su perfil de seguridad es aceptable [Gilhus 2011], no debemos olvidar que puede producir alteraciones de las series hematológicas y de las enzimas hepáticas o pancreatitis que requerirán una monitorización analítica estrecha. Su principal inconveniente es el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la mejoría clínica perceptible, que puede ser de hasta 4-12 meses, con máximo efecto a los 6-24 meses [Skeie 2010].

El Tacrolimus es un inhibidor de la calcineurina, por lo que inhibe la proliferación de los leucocitos T activados y también actúa sobre el receptor de rianodina del retículo sarcoplasmático en la célula muscular [Gilhus 2011]. Puede emplearse sólo o combinado con Prednisona a dosis bajas u otros inmunosupresores. Por su vida media y metabolismo se recomienda su administración cada 12 horas y el control periódico de la función renal y de los niveles de su metabolito activo, el FK506, en sangre [Ponseti 2008, Ponseti 2006].

También se administra el Micofenolato Mofetilo, a pesar de no haber podido demostrar un efecto positivo en diversos ensayos clínicos controlados. El metotrexate no reúne suficiente evidencia de eficacia en MG. No obstante, los expertos recomiendan la prescripción de ambos fármacos en el tratamiento de mantenimiento de la MG leve, en combinación con otros fármacos inmunomoduladores como la Prednisona o la Azatioprina [Skeie 2010, Gilhus 2011]. Su prescripción está contraindicada en el embarazo, ya que ambos fármacos aumentan el riesgo teratogénico [Sanders 2018].

La Ciclosporina A y la Ciclofosfamida serían considerados fármacos inmunomoduladores de segunda elección por su perfil de seguridad, con efectos secundarios potencialmente graves.

El Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra los leucocitos B CD20+ que debería reservarse para el tratamiento de aquellos pacientes con MG refractaria, con síntomas graves y que no hayan respondido a dos o más inmunosupresores clásicos previamente. También sería útil en las formas graves de MG con anticuerpos anti-MuSK.

En los últimos 5 años han ido apareciendo ensayos clínicos con nuevos fármacos para MG en alguno de los cuales ha participado nuestro grupo de investigación clínica [Howard 2017, Andersen 2019, Muppidi 2019].

El primero de los nuevos fármacos es Eculizumab, que ha demostrado su seguridad y eficacia en un ensayo aleatorizado multicéntrico internacional fase III en pacientes con formas refractarias de la enfermedad.

Eculizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que actúa como ligando específico inhibidor de la proteína C5 del sistema del complemento, evitando la formación del complejo de ataque a la membrana, implicado en los mecanismos fisiopatológicos de la MG. Este fármaco está actualmente aprobado, especialmente para las formas generalizadas anti-AChR positivas y refractarias de la enfermedad [Howard 2017, Dillhon 2018, Dalakas 2019].

Actualmente, se encuentra en fase de desarrollo un nueva entidad conocida como molécula M281 en un ensayo de fase II. Se trata de nuevo fármaco biológico en forma de anticuerpos contra la forma neonatal del receptor Fc de las inmunoglobulinas. Este ensayo, en el cual participa nuestro grupo de investigación, está aún en fase de reclutamiento activo [Ling 2018].

1.6.3. Indicaciones y uso de las inmunoglobulinas y la plasmaféresis

Las inmunoglobulinas por vía endovenosa (IVIg) y la plasmaféresis (PLEX) demostraron inicialmente una eficacia similar para el tratamiento de la crisis miasténica [Gadjos 1998]. Aunque, según el consenso de algunos expertos, parece ser que PLEX es más efectiva y actuaría más rápido que IVIg. No obstante, la elección dependerá de la disponibilidad en el centro hospitalario, el acceso venoso del paciente, teniendo en cuenta un mayor riesgo de complicaciones intravasculares con el uso de PLEX [Sanders 2018].

La administración de las IVIg se extiende a otras indicaciones como el (1) tratamiento del empeoramiento rápido y progresivo de la enfermedad, (2) la preparación de cirugía mayor o timentomía en función de la gravedad del paciente [Sanders 2018, Gamez 2014], (3) el tratamiento de mantenimiento en MG en pacientes con formas graves, de difícil manejo terapéutico y/o con mayor riesgo de efectos secundarios del tratamiento inmunosupresor prolongado, (4) en pacientes miasténicas en período de gestación y lactancia [Gamez 2017] y (5) en MG juvenil [Sanders 2018].

1.6.4. Timectomía

La timectomía se recomienda en pacientes con timoma asociado o en aquellos pacientes con MG generalizada de debut temprano (EOMG) con anti-AChR positivos. La mejoría clínica se produce habitualmente de forma gradualmente entre los 2 y los 24 meses post-cirugía y es más consistente en el grupo de pacientes con timoma que en el de hiperplasia tímica [Ponseti 2008, Ponseti 2009].

En pacientes con MG generalizada de debut tardío, se recomienda la timectomía cuando las pruebas de imagen (TC o RM torácica) detecten la presencia de un timoma o una clara hiperplasia. Su indicación es controvertida en las formas de MG seronegativa. En las formas oculares puras y en los casos de MG-MuSK no se recomienda la cirugía [Skeie 2010, Gilhus 2011].

La timectomía debe realizarse en centros hospitalarios de tercer nivel con experiencia amplia en este tipo de cirugía y siempre dentro de unidades especializadas multidisciplinarias donde se produzca de forma natural un manejo pre y post-quirúrgico coordinado del paciente por parte de los diferentes especialistas implicados: neurólogo, cirujano torácico, radiólogo, anestesiólogo, oncólogo médico, radioterapeuta, intensivista, rehabilitador físico y cardiorrespiratorio, entre otros. El procedimiento quirúrgico deberá programarse cuando los síntomas de la MG se encuentren estables [Ponseti 2008].

Recientemente se ha publicado un ensayo clínico randomizado doble ciego sobre la eficacia de la timectomía en MG, en el cual se comparó la eficacia de la timectomía junto a Prednisona frente a la Prednisona aislada en pacientes con MG no timomatosa. Con un seguimiento clínico de 3 años, se evaluaron 126 pacientes con MG generalizada (MGFA II-V) con títulos altos de anti-AChR. Los resultados mostraron una mejoría en el pronóstico de los pacientes timectomizados en base a diferencias significativas en las puntuaciones obtenidas en la escala QMG durante el seguimiento [Wolfe 2016]. Aunque las dosis de prednisona utilizadas eran mucho más altas que las que se utilizan habitualmente en clínica [Gamez 2017].

1.7. Etiopatogenia de la miastenia gravis autoinmune

La MG autoinmune es por definición una **enfermedad esporádica, con una base etiopatogénica compleja y multifactorial** que combina la influencia de factores ambientales, genéticos y epigenéticos interrelacionados que son los responsables de la pérdida de la tolerancia inmunológica [Salvado 2016].

Los factores ambientales incluyen la modulación del propio sistema inmunológico por parte de las hormonas sexuales, especialmente los estrógenos, la expresión variable del gen AIRE en el timo y algunas variantes genéticas (SNPs) concretas en el complejo HLA, que propiciarían una mayor predisposición de las mujeres a desarrollar enfermedades autoinmunes [Salvado 2016, Berrih-Aknin 2018].

Los factores epigenéticos estudiados se han focalizado en el papel de algunos microRNA en la disregulación de la respuesta inmunológica y la aparición de enfermedades autoinmunes como la MG [Avidan 2014, Berrih-Aknin 2014].

1.7.1. Influencia de los factores genéticos en MG autoinmune

La realización de estudios de concordancia en gemelos puede resultar técnicamente compleja cuando se trata de enfermedades autoinmunes como la MG. Esto es debido a que se trata enfermedades raras, con baja prevalencia, que los estudios de zigosis no siempre son suficientemente rigurosos y que el seguimiento evolutivo de los gemelos, aunque se produzca en un mismo ambiente, puede no ser consistente (sobre todo cuando el inicio de los síntomas difiere temporalmente entre ellos).

Concretamente en MG, la mayoría de datos disponibles se basan en series de casos y revisiones de la literatura. Este hecho explicaría la discordancia entre los resultados de diversos **estudios de concordancia en gemelos que oscilan en monozigotos entre un 30-40% y en dizigotos entre un 4-14%** [Bogdanos 2012, Avidan 2014].

Aunque el complejo principal de histocompatibilidad HLA ha sido reconocido tradicionalmente como el principal factor genético de predisposición en MG autoinmune [Saruhan 2016], se ha sugerido que otros factores genéticos predisponentes también están involucrados en MG [Zagoriti 2013].

En los últimos 20 años, se han reportado **varios genes como posibles factores de riesgo principales o factores modificantes** (por ejemplo, HLA, ENOX1, CTLA4, PTPN22, RYR3, CACNA1S y SLAMF1) **en las formas familiar y esporádica de MG**, principalmente a

través de estudios GWAS [Vandiendonck 2005, Renton 2015, Gregersen 2012, Seldin 2015, Viken 2007, Li 2017]. Los resultados de la asociación de los genes CTLA4 y HLA-DQA1 no se han podido replicar en un estudio GWAS en una cohorte coreana no relacionada, en la que se identificaron las variantes de los genes RYR3, CACNA1S y SLAMF1 como factores predisponentes factibles para FAMG y SAMG [Na 2014].

Un aspecto que no deberíamos obviar es la existencia de diferencias en la base o *background* genético condicionadas por la procedencia étnico-geográfica de la población estudiada. Esta diversidad implica que, en poblaciones concretas, unas variantes genéticas puede asociarse o influir sobre posibles factores genéticos de riesgo, protección o modificantes de fenotipo en MG, como sucede con el complejo genético HLA, y que esas mismas variantes genéticas no se asocien con la enfermedad en otras poblaciones étnicamente diferentes.

1.7.2. Síndromes miasténicos congénitos: como diferenciarlos de las formas de MG autoinmune

Los síndromes miasténicos congénitos (CMS, del inglés congenital myasthenic syndromes) son enfermedades de la placa neuromuscular secundarias a mutaciones genéticas en algunas de sus proteínas, receptores o componentes, que generan una alteración de la transmisión neuromuscular a nivel pre-sináptico, en la misma sinapsis o a nivel post-sináptico.

Los CMS se caracterizan por ser enfermedades raras que suelen manifestarse en el nacimiento en la infancia precoz, con síntomas y signos de intensidad muy variable, que comprenden la debilidad muscular y la hipotonía, la ptosis palpebral o la oftalmoparesia, la dificultad para la succión, el llanto débil y en casos más graves, episodios de apneas e insuficiencia respiratoria aguda. No obstante, algunos casos leves no pueden ser diagnosticados hasta la adolescencia o la edad adulta [Abicht 2003].

A diferencia de la miastenia gravis, familiar o esporádica, en los CMS no intervienen mecanismos autoinmunes. Por este motivo, los pacientes con CMS no tienen anticuerpos frente al AChR ni ningún otro componente de la placa neuromuscular [Vincent 1979, Abicht 2003, Engel 2018].

1.7.3. Bases de la inmunidad humoral y celular en MG

La respuesta inmunológica se basa en la actuación conjunta de los **mecanismos de inmunidad innata y adaptativa**. La inmunidad innata proporciona una respuesta rápida, pero inespecífica, contra los microorganismos patógenos o las células cancerígenas que invaden o proliferan en nuestro organismo [Janeway 2003]. Participan en esta respuesta innata, células mieloides (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, monocitos y macrófagos) y linfoides (células *natural killer* o NK) que usan mecanismos de fagocitosis, lisis, formación de radicales libres, citólisis mediante perforinas o apoptosis para destruir al agente patógeno.

Algunas de estas células actúan como células presentadoras de antígenos, como los monocitos en sangre periférica o los macrófagos en los tejidos, así como las propias células presentadoras de antígenos (CPA, del inglés *antigen presenting cells* o APCs) a los linfocitos B o T, integrantes de la respuesta inmunológica adaptativa, mediante las moléculas MHC.

El sistema de inmunidad adaptativa genera una respuesta altamente específica frente a un antígeno determinado, y aunque puede ser muy heterogénea y se produce de forma más lenta (requiere días-semanas), es capaz de garantizar la memoria inmunológica.

Los linfocitos B (LB), encargados de la respuesta inmunitaria humoral (produciendo inmunoglobulinas circulantes o Igs) se producen en la médula ósea y los ganglios linfáticos y circulan por sangre periférica, pudiendo actuar también como CPAs en el timo, donde interaccionarían con los linfocitos T (LT), responsables de la inmunidad celular [Janeway 2003, Kallon 2011].

Las técnicas de inmunofenotipado han permitido clasificar a los linfocitos en clonas de diferenciación. Así por ejemplo, todos los LT serán CD3+ y se diferenciarán posteriormente en CD3+CD4+ (LT helper), incluyendo a los Th1, Th2, Th17 y LT reguladores (Treg) y CD3+CD8+ (LT citotóxicos). Los LTh1 y Th17 favorecen la inflamación a través de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, Th2 ayuda a los LB a controlar la inflamación y Treg son responsables de la tolerancia inmunológica, protegiendo al individuo de la autoinmunidad [Gray 2014].

En miastenia gravis, como ocurre en otras enfermedades autoinmunes, **la formación de centros germinales (CG) se produce en el timo, órgano inflamatorio en esta enfermedad.**

La formación de CG favorece la proliferación de células B productoras de anticuerpos contra el AChR, que ejercen un rol claramente patogénico demostrado en múltiples trabajos in vitro e in vivo, usando modelos animales de MG experimental (EAMG) [Simpson 1960, Goldstein 1971, Appel 1975, Lennon 1975, Aharonov 1975, Sagar 1980] así como una disregulación de la inmunidad celular (especialmente por la función deficitaria de LTreg y el incremento de actividad de LTh17), que producirán citoquinas y factores pro-inflamatorios, favoreciendo así la angiogénesis y el reclutamiento celular de sangre periférica (CXCL13, CCL21, SDF-1, IFN- γ , TLR, CXCR3, entre otros) hacía los CG [Sagar 1980, Berrih-Aknin 2014, Sudres 2018]. La disregulación de LTreg (CD4+CD25+), en estrecha relación con la compleja regulación por parte del factor de transcripción FOXP3, se ha relacionado directamente con el desarrollo de la mayoría de enfermedades autoinmunes, incluida la miastenia gravis [Domínguez-Villar M 2018, Thiruppathi 2012]. Además, en pacientes con timoma, se ha podido demostrar una deficiencia de componentes moleculares indispensables para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, como los derivados del gen AIRE [Berrih-Aknin 2014].

Por mecanismos aun no bien conocidos, esta **respuesta inmunológica auto-reactiva es capaz de perpetuarse y cronificarse**. Esto sería probablemente a causa de una confluencia de dichos factores pro-inflamatorios hiperactivados y a la ausencia de control por parte de las células reguladoras (Treg), en individuos genéticamente predispuestos en los que confluirían ciertos factores ambientales, epigenéticos o intrínsecos, que darían lugar a la **activación de las vías de la autoinmunidad** [Sudres M, 2018].

La disminución del número de receptores de acetilcolina funcionales en la placa neuromuscular se produce por tres posibles mecanismos (figura 11) [Meriglioli 2009, Conti-Fine 2006, Kusner 2018]: (1) la lisis mediada por el complemento, que finaliza con la activación del complejo de ataque a la membrana y que ocasiona la lesión de la membrana muscular postsináptica. Ésta genera aplanamiento y pérdida progresiva de la arquitectura plegada característica de la placa neuromuscular, así como una disminución del número de AChR funcionales y de canales de sodio voltaje-dependientes, con el consiguiente aumento del umbral excitatorio necesario para la despolarización y formación del potencial de acción motor; (2) la internalización (endocitosis) y degradación de los AChR causada por el entrecruzamiento o *cross-linkage* de los receptores secundaria a la unión de anticuerpos divalentes (modulación antigénica) y (3) el bloqueo funcional directo del AChR por parte de los anticuerpos específicos al sitio de unión de la acetilcolina al receptor.

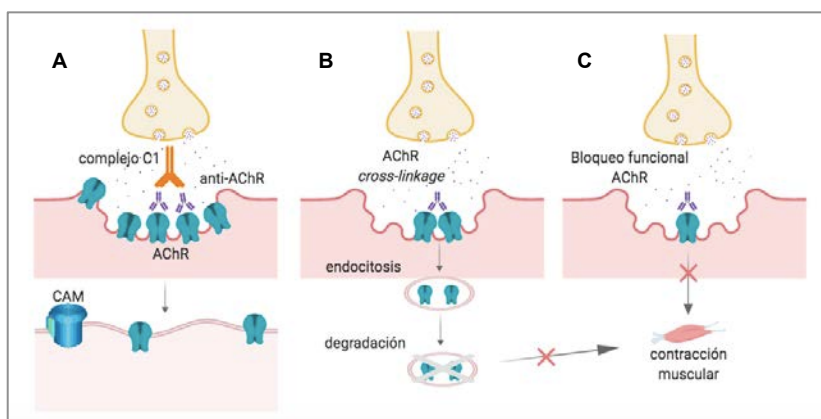


Figura 11. Representación esquemática de los tres mecanismos de reducción del número de AChR funcionales en la placa NM en MG. **A.** lisis por complemento. **B.** modulación antigénica. **C.** bloqueo funcional.

La **inmunosenescencia**, o el envejecimiento del sistema inmune, afecta tanto a los mecanismos de inmunidad adaptativa como de la respuesta innata. Estas alteraciones se traducen en una mayor facilidad para las infecciones, una menor eficacia en la respuesta a las vacunaciones, así como un mayor riesgo de sufrir enfermedades autoinmunes en personas de edad avanzada, por un aumento de la auto-reactividad y la pérdida de tolerancia inmunológica. Los cambios epigenéticos que ocurren en estas edades también facilitarían la aparición de EAI [Montoya-Ortiz 2013].

En el mismo sentido, los estudios de la función tímica demuestran una gran variabilidad interindividual respecto a la curva teórica establecida en base a estudios previos, de manera que una persona de edad avanzada podría mantener el mismo nivel de actividad tímica que una persona joven, recordando que el timo expresa la mayoría de los antígenos propios de cada individuo (del inglés *self-antigens*) [Pujol-Borrell 2009].

1.7.4. El complejo principal de histocompatibilidad (CPH o MHC) y los antígenos leucocitarios humanos (HLA): características principales

El **complejo principal de histocompatibilidad** (CPH o MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) está formado por un conjunto de regiones génicas situadas en el brazo corto del cromosoma 6 humano (cr. 6p) que codifican las proteínas denominadas **antígenos leucocitarios humanos** (HLA, del inglés *human leukocitary antigens*) (figura 12).

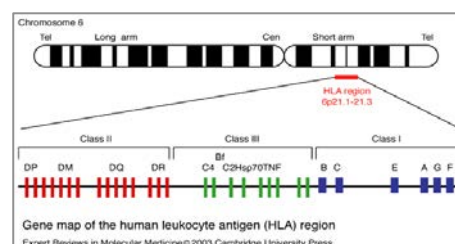


Figura 12. Localización del CMH (cr. 6p).

Estos genes forman parte de los denominados genes de respuesta inmune (IR, del inglés *immune response genes*) y su extensión es de aproximadamente 7 Mb (figura 13). El sistema **HLA** contiene **aloantígenos** de expresión codominante. Los alelos HLA se transmiten en forma de 'bloques' llamados **haplotipos** a la siguiente generación. Es decir, que cada individuo heredara de sus progenitores dos haplotipos HLA (uno materno y otro paterno) que se expresaran de igual forma (figura 14).

Estos antígenos, que se expresan en la superficie celular, se clasifican en tres clases [Ryder 2003, Svejgaard 1981, Dausset 1981, Little 1999]:

- HLA de **clase I** (genes clásicos A, B y C y genes no clásicos E, F y G): más ubicuos, presentes en todas las superficies celulares y que codifican por ejemplo los isotipos que expresan los hematíes en su membrana celular. En el sistema inmune, se encuentran en las células linfocitarias T citotóxicas (CD8+).
- HLA de **clase II** (genes clásicos DR, DQ y genes no clásicos DP, DM y DO) de expresión restringida en células especializadas, como los linfocitos T (CD4+) y células mononucleares (macrófagos).
- HLA de **clase III** (Bf, C2, C4) que codifican las proteínas del sistema del complemento.

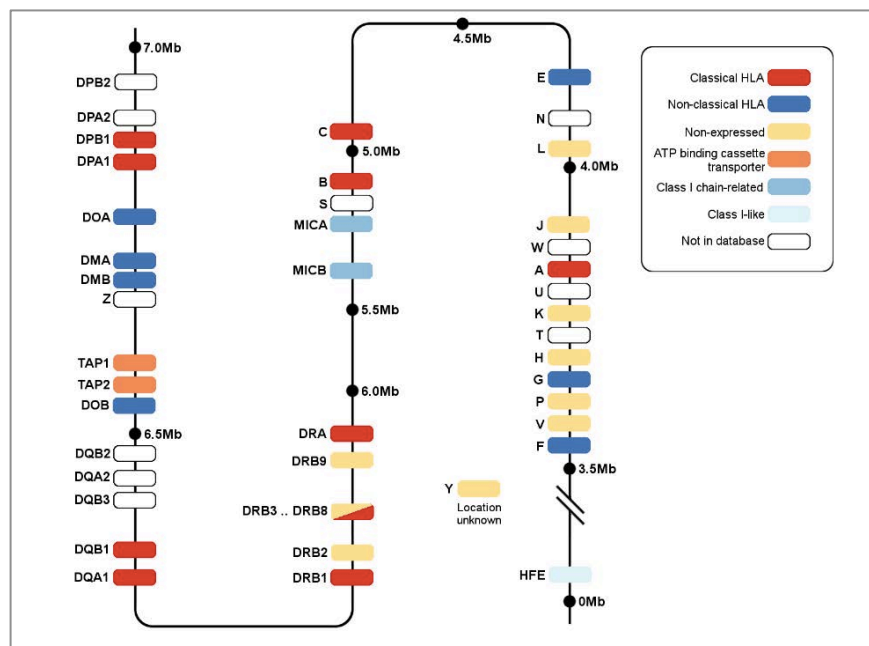


Figura 13. Estructura esquemática del loci HLA humano [Marsh 2010, Robinson 2015]

Los antígenos **HLA de clase I** (figura 15A) son glicoproteínas heterodiméricas de membrana constituidas por una cadena pesada α polimórfica (43kDa) codificada por el MHC de clase I en el cromosoma 6p, que se enlaza covalentemente a una unidad β 2 microglobulina (12kDa) no polimórfica codificada en el cromosoma 15. La cadena α se compone de 3 subunidades α 1 (exón 2), α 2 (exón 3) y α 3. Las subunidades α 1 y α 2 (codificadas por los exones 2 y 3 respectivamente) forman la zona de unión al péptido (antígeno).

Las moléculas **HLA de clase II** (figura 15A) son también glicoproteínas heterodiméricas transmembrana formadas por una cadena α y una cadena β polimórficas, cada una de ellas con dos dominios (α 1, α 2, β 1 y β 2) codificadas en el cromosoma 6 (6p21.3). Las subunidades α 1 y β 1, situadas en la parte más próxima a la membrana celular, forman la zona de unión al péptido. La mayoría de polimorfismos en las moléculas de clase II se encuentran en el dominio β 1 [Bodmer 1980, Klein 2000, Kallon 2011].

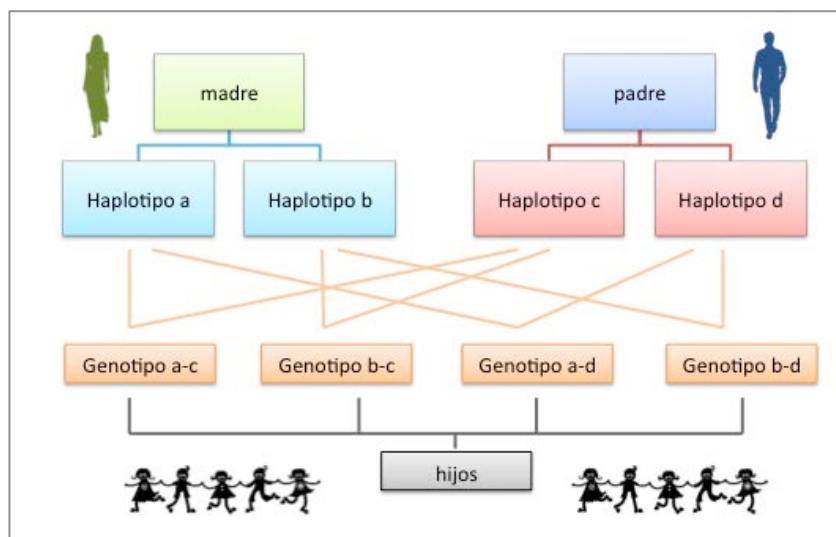


Figura 14. Ejemplo de patrón de herencia codominante para los genotipos y haplotipos HLA

El sistema HLA fue descubierto por Jean Dausset en 1952, cuando, siguiendo las investigaciones de Gorer y Snell en sus estudios de histocompatibilidad y rechazo en ratones [Vandiedonck 2009].

Este autor describía por primera vez el papel del HLA-A2 humano, que denominó *human leukocyte blood group* [Dausset 1981].

Lo describió con el uso de técnicas serológicas [Ryder 2003, Svejgaard 1994] que le permitieron detallar algunas de sus principales características distintivas: el auto-reconocimiento y el polimorfismo. Este trabajo le hizo merecer el Premio Nobel en 1958, cuando publicó sus resultados.

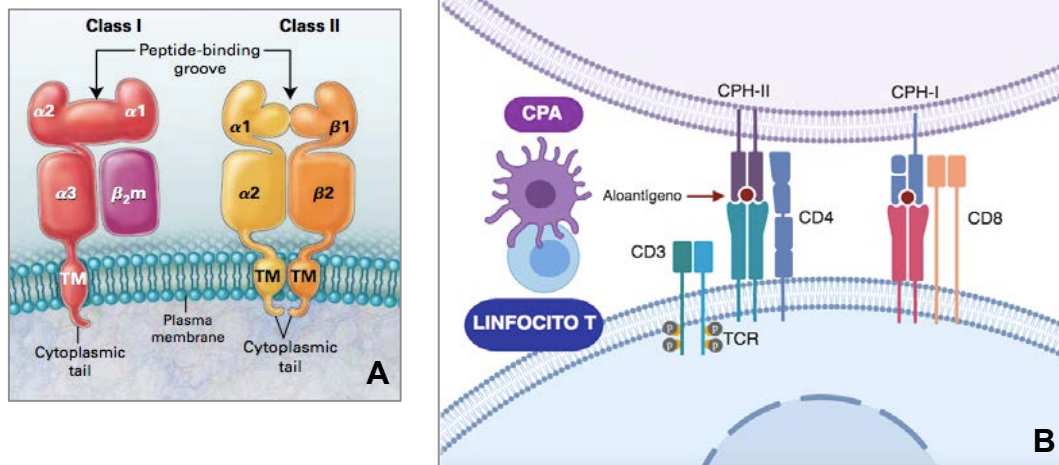


Figura 15. A. Estructura terciaria de las moléculas HLA de clase I y II. Reproducido con el permiso de Copyright Massachusetts Medical Society (Klein J, Sato A. N Engl J Med 2000; 343:702-709) (101)[Klein 2000] **B.** Presentación por las células presentadoras de antígenos (CPA) y reconocimiento antigénico por parte de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de tipo I y II en la membrana de los linfocitos T subtipos CD8 y CD4 respectivamente.

El mecanismo de **auto-reconocimiento** (del inglés, *self-recognition*) se considera la base del sistema inmune y se produce de forma continuada, sobretodo mediante moléculas HLA de clase I, pero también de clase II (cooperación intercelular) (figura 15B). **El sistema HLA es poligénico y extremadamente polimórfico**, propiedad que le confiere la capacidad de un reconocimiento antigénico múltiple, garantizando una unión altamente específica de los péptidos en la zona de unión y reconocimiento antigénico [Dausset 1981].

La complejidad del sistema MHC se debe a su polimorfismo, que juega un papel central en el auto-reconocimiento. Su mantenimiento a lo largo de los tiempos, es a través de los llamados 'frozen blocks', así como la existencia de determinadas regiones en intenso desequilibrio de ligamento (LD, del inglés, linkage disequilibrium). Las zonas denominadas 'hotspots' facilitan la recombinación génica en estas regiones y hacen posible que los genes muy relacionados se transmitan conjuntamente durante varias generaciones.

Estas características le otorgan, a su vez, una ventaja evolutiva clara para el reconocimiento de una gran diversidad de patógenos [Dausset 1981, Little 1999].

Posteriormente, otros investigadores prosiguieron el trabajo de Dausset en HLA-A2 y A3 y Bw4-Bw6, hasta que progresivamente, las técnicas de biología molecular sustituyeron a las serológicas en la tipificación de los antígenos HLA. Las técnicas moleculares permitirían identificar de forma más efectiva multitud de variantes del MHC humano [Little 1999, Marsh 2010].

Actualmente y desde 1968, los alelos HLA se enumeran y clasifican siguiendo las guías de la OMS elaboradas por el Comité para la Nomenclatura de los factores del Sistema HLA. Las guías vigentes, acordadas en los dos últimos *Workshop* internacionales del grupo de expertos (*14th and 15th International HLA and Immunogenetics Workshops*) celebrados en 2005 y 2008 respectivamente fueron publicadas en 2010 [Marsh, 2010].

Estas guías, así como sus actualizaciones sucesivas (hasta finales de 2018), pueden consultarse online en la página web oficial de la IMGT/HLA (International ImMunoGeneTics project), repositorio oficial de esta base de datos internacional que se enmarca dentro del proyecto Immuno Polymorphysm Database (IPD) (www.ebi.ac.uk/imgt/hla) [Robinson, 2015], de la que actualmente está disponible la versión 3.36.0 (17-04-2019).

La nomenclatura HLA internacional actual [Marsh, 2010] se basa en los resultados de la **tipificación HLA mediante técnicas de biología molecular** y se expresa de la siguiente forma (figura 16):

Prefijo	Guión	Gen	*	Grupo alélico	:	Proteína HLA	:	Variante sinónima	:	Variantes región no-codificante	Sufijo cambios expresión
HLA	-	A	*	02	:	101	:	01	:	02	N

Nomenclatura	Indica
HLA-DRB1	Locus HLA
HLA-DRB1*13	Grupo de alelos que codifican un antígeno
HLA-DRB1*13:01	Alelo HLA específico
HLA-DRB1*13:01:02	Alelo con mutación sinónima (silente)
HLA-DRB1*13:01:01:02	Alelo con mutación fuera de los exones
HLA-A*24:09N	Alelo nulo (no se expresa)
HLA-A*30:14L	Alelo con expresión reducida "low"
HLA-B*44:02:01:02S	Alelo que se expresa sólo como una proteína secretada
HLA-A*32:11Q	Alelo con expresión "cuestionable", no se ha confirmado el efecto sobre la expresión

Figura 16. Ejemplo de la nomenclatura internacional aceptada para la tipificación de alelos HLA. Adaptado de la página web oficial de IPD-IGMT/HLA (www.ebi.ac.uk/imgt/hla).

1.7.5. Relación entre el HLA y las enfermedades autoinmunes

El papel del complejo génico HLA, con sus correspondientes alelos y haplotipos, y su asociación a diferentes enfermedades autoinmunes ha motivado numerosas publicaciones científicas, algunas de ellas intentando profundizar en las bases fundamentales de sus mecanismos moleculares.

Algunas variantes concretas de los alelos **DRB1** y/o **DQB1** se han asociado a la aparición de diversas enfermedades autoinmunes, entre las cuales, podemos nombrar la enfermedad de Graves (HLA-B*08/-DRB1*03), la celiacía (HLA-DQB1*0201), la diabetes tipo 1 (HLA-DRB1*03/04), la anemia perniciosa (HLA-DRB1*03/04), la artritis reumatoide (HLA-DRB1*04), la espondilitis anquilosante (HLA-B*27), el lupus eritematoso sistémico (HLA-B*08/-DRB1*03) o la esclerosis múltiple (DRB1*15:01, DRB1*03:01 y DQB1*02:01) [Naeim 1978, Ryder 2003, Svejgaard 1994, Price 1999, Larsen 2004, Kallon 2011, IMSGC 2012].

1.7.6. Técnicas serológicas y moleculares de tipificación HLA

Para la determinación del sistema HLA se pueden utilizar dos tipos de técnicas: serológicas y moleculares. Los estudios serológicos, se basan en el test de microlinfotoxicidad (o citotoxicidad mediada por complemento) especialmente en el campo de los trasplantes y permiten la identificación de las moléculas HLA por reconocimiento de las mismas sobre la superficie celular. Es decir, se trata de una técnica de estudio del fenotipo mediante anticuerpos. En cambio, los estudios de biología molecular consisten en la determinación del genotipo o secuencia genética que codifica las proteínas HLA (figura 17).

Las técnicas de determinación del HLA pueden clasificarse según su resolución en:

- técnicas de baja resolución: equivalente serológico (ej. DR3 o DRB1*03)
- técnicas de alta resolución: a nivel alélico (ej. DRB1*03:01)

Las principales técnicas moleculares de tipificación HLA basadas en el ADN (PCR) se detallan a continuación:

1. **PCR-SSP**: consiste en realizar PCRs específicas para cada gen, empleando múltiples pares de cebadores (*primers*) alelo-específicos [Bunce 2013, Ciosa 2018].

2. **PCR-SSO**: utiliza oligonucleótidos o sondas específicas y se basa en técnicas de hibridación con ADN amplificado marcado con ellas. Posteriormente, se procede a la lectura con citofluorimetría y se interpretan los resultados con un software específico. Se trata de un sistema robusto y fiable, ideal para un gran número de muestras, pero genera patrones ambiguos (no separa los dos alelos), es necesario un procesamiento post-PCR y un gran número de sondas [Nong 2007, Dalva 2014].
3. **PCR-SBT**: tipificación basada en la secuenciación directa del gen, es una técnica muy precisa, que permite la amplificación preferencial de un alelo. No obstante, también requiere de un procesamiento post-PCR, es más costosa en tiempo y equipamiento y se pueden mantener las ambigüedades [Latham 2014, Cargou 2019].
4. **NGS**: Next-Generation Sequencing, es una metodología que es capaz de generar una gran cantidad de datos sobre la secuenciación del genoma completo en poco tiempo y ahorrando recursos económicos. Su mayor inconveniente es que esta enorme cantidad de información requiere de un procesamiento bioinformático especializado posterior. En inmunología y trasplante, el NGS se está imponiendo para estudiar de forma dirigida los genes HLA utilizando protocolos de PCR long-range y dirigiendo la amplificación del genoma a ciertos exones específicos (targeting). Posteriormente se fragmentan, se preparan las librerías con los fragmentos de las secuencias y se alinean para conseguir la secuencia genómica del probando. Estas técnicas permiten el análisis de muestras procedentes de diferentes individuos a la vez, mediante PCR mutliplex y una **mayor sensibilidad y especificidad de los resultados, reduciendo las ambigüedades** [Latham 2014, Closa 2018].

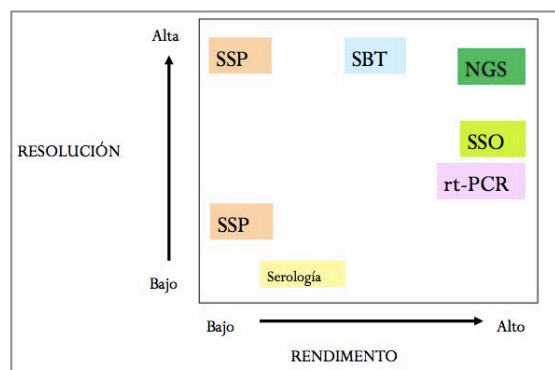


Figura 17. Esquema comparativo de las técnicas serológicas y moleculares para la tipificación de HLA, su rendimiento y resolución. Gentileza del Dr. J.L. Caro, Servei Immunologia. Centre de Diagnòstic Biomèdic (CDB). Hospital Clínic Barcelona.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Diversos factores genéticos, entre los que destacan el complejo multigénico HLA y/o genes principales como ENOX1, se han asociado como factores de riesgo de MG en poblaciones caucásicas. En población española, no se conoce si existen factores genéticos asociados a casos de MG. Es posible que algunas variantes genéticas en estos genes sean determinantes en la aparición de la enfermedad y también en el fenotipo clínico, serológico e histopatológico de las formas esporádicas y familiares de MG de origen español.

2.2. Objetivo principal

Investigar la influencia de los genes de la superfamilia HLA y del gen ENOX1 en el riesgo, el fenotipo clínico, serológico e histopatológico de las formas esporádicas y familiares de MG en una población española.

2.3. Objetivos secundarios

1. Analizar el rol del complejo HLA (alelos y haplotipos), mediante técnicas de secuenciación masiva de alta resolución, como posible factor genético de riesgo, susceptibilidad, protección o modificante de fenotipo en población española de pacientes SAMG.
2. Estudiar el papel del complejo HLA como posible factor genético de riesgo /modificación en pacientes FAMG.
3. Investigar la frecuencia de mutaciones y variantes en el gen ENOX1 como gen principal relacionado con MG en nuestra población de pacientes FAMG y SAMG.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Sujetos en estudio

En nuestra Unidad Multidisciplinaria de Miastenia Gravis, perteneciente a la Unidad de Enfermedades Neuromusculares y Raras – CSUR – ERN NMD del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Vall d’Hebron de Barcelona (HUVH), se atendieron y monitorizaron más de 400 pacientes entre 2000 y 2014. Estos individuos otorgaron su consentimiento informado escrito para la participación en los estudios clínicos y de investigación clínico-básica en miastenia que posteriormente se detallan, autorizando también al equipo investigador a la extracción de muestras de sangre periférica destinadas a este fin, de acuerdo con las directrices del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HUVH y siguiendo las normas de la Declaración de Helsinki.

El diagnóstico de MG se estableció en base a la historia clínica del paciente, signos y síntomas, los resultados del estudio neurofisiológico (estimulación nerviosa repetitiva y SFEMG), el test de edrofonio y la determinación sérica de anticuerpos anti-AChR. En los pacientes seronegativos, se estudió la presencia de anticuerpos anti-MuSK. Las variables miasténicas incluidas en los análisis comprendían la clase de MG al debut, la edad de debut de la MG, la puntuación de la escala quantitative myasthenia gravis (QMG) para la gravedad de la enfermedad, los tratamientos recibidos, el estatus post-intervención (PIS), la histopatología tímica, los títulos de anticuerpos anti-AChR y anti-MuSK, la presencia de enfermedades autoinmunes de forma concomitante y el antecedente de exacerbación y/o crisis miasténica previa [Gamez J 2017]. El protocolo de estudio se diseñó siguiendo las recomendaciones para los estándares de investigación clínica de la Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) [Jaretzki 2000].

Para el estudio caso-control de HLA en formas familiares y esporádicas de MG, los sujetos controles, no afectados, fueron obtenidos del Banc de Sang i Teixits de Barcelona versión 2016, comprendiendo 280 donantes españoles sanos de médula ósea.

Para el estudio caso-control de HLA en formas esporádicas de MG, los sujetos controles, no afectados, fueron obtenidos del Banc de Sang i Teixits de Barcelona versión 2017, que comprendía más de 2000 donantes españoles sanos de médula ósea.

Para el estudio del gen ENOX1 mediante tecnología KASPar, se emplearon 598 sujetos control de población española obtenidos del Banco Nacional de ADN (Universidad de Salamanca), no afectados de miastenia gravis u otras enfermedades autoinmunes. Se obtuvieron datos de edad, sexo, procedencia geográfica y comorbilidad.

3.1.1. Recogida de datos clínicos

Se realizó la revisión retrospectiva de los datos clínicos en historia clínica informatizada en programa SAP logon versión ERP 6.0 (2005) y bases de datos propias de la Unidad Multidisciplinaria de Miastenia Gravis, perteneciente a la Unidad de Enfermedades Neuromusculares y Raras – CSUR – ERN NMD del Servicio de Neurología del HUVH por parte de un equipo multidisciplinar supervisado por dos neurólogos especializados en miastenia gravis.

3.1.2. Definición de casos y controles

Los casos se clasificaron de acuerdo a su patrón de herencia en formas familiares de miastenia gravis autoinmune (FAMG) y en pacientes con miastenia gravis autoinmune esporádica (SAMG).

La cohorte de casos se clasificó posteriormente según la edad de debut de los síntomas en 3 categorías: 1. Debut temprano o Early-onset (EOMG): MG de inicio a los 40 años o previamente [Meriggioli 2009]; 2. Debut tardío o Late-onset (LOMG): inicio entre los 41 y los 65 años de edad; 3. Debut muy tardío o Very Late-onset (VLOMG): en mayores de 65 años [Alkhawajah NM 2017, Sakai W 2016].

Para el grupo control, los sujetos no afectados fueron seleccionados aleatoriamente de la base de datos anonimizada del Banc de Sang i Teixits de Barcelona versión 2016, que comprendía 280 donantes españoles sanos de médula ósea (estudio HLA FAMG, SAMG vs controles) y de la versión 2017 que comprendía más de 2000 donantes españoles sanos de médula ósea (estudio HLA SAMG).

Para el estudio del gen ENOX1 mediante tecnología KASPar, se emplearon 598 sujetos control de población española obtenidos del Banco Nacional de DNA (Universidad de Salamanca), no afectados de miastenia gravis u otras enfermedades autoinmunes. Se obtuvieron datos de edad, sexo, procedencia geográfica y comorbilidad.

3.2. Diseño de los estudios

3.2.1. Estudio de prevalencia de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española

En nuestra cohorte de miastenia gravis autoinmune, identificamos 16 pacientes con formas familiares de MG autoinmune (FAMG), pertenecientes a 8 familias no emparentadas ni relacionadas. Se diseñó un estudio clínico descriptivo, en el que estos pacientes fueron clasificados según la edad de inicio de la enfermedad, la clase MGFA al debut, sus características clínicas, inmunológicas e histopatológicas, así como la existencia de otras enfermedades autoinmunes concomitantes [Salvado M 2016].

3.2.2. Estudio caso-control en miastenia gravis autoinmune familiar (FAMG)

Se utilizó un diseño de estudio clínico retrospectivo, abierto, pragmático, caso-control para analizar la frecuencia y distribución de los alelos HLA-DRB1 y -DQB1 en las formas familiares de miastenia gravis autoinmune (FAMG), comparándolos inicialmente con una cohorte de individuos controles sanos y posteriormente con una muestra de pacientes con miastenia gravis autoinmune esporádica (SAMG).

Se identificaron y tipificaron 16 casos de FAMG pertenecientes a 8 familias no relacionadas. Los pacientes con SAMG fueron randomizados por edad y sexo y se seleccionaron 32 sujetos (2 SAMG por cada caso FAMG). Para el grupo control 48 sujetos no afectados fueron seleccionados aleatoriamente (3 controles por cada caso FAMG, randomizados por edad y sexo) de la base de datos anonimizada del Banc de Sang i Teixits de Barcelona versión 2016, que comprendía 280 donantes españoles sanos de médula ósea.

Posteriormente, los pacientes fueron estratificados en subgrupos de acuerdo a la edad de debut de la MG. Los pacientes con miastenia de debut a los 40 años o antes, es decir de debut temprano o early onset (EOMG) [Meriggioli 2009]; los que debutaron después de los 40 años o late-onset (LOMG) y los de debut muy tardío (VLOMG), a partir de los 65 años de edad [Alkhawajah NM 2013, Sakai W 2016].

3.2.3. Estudio caso-control en miastenia gravis autoinmune esporádica (SAMG)

Para el análisis de la frecuencia y distribución de alelos y haplotipos HLA de alta resolución en pacientes con miastenia gravis autoinmune esporádica, se empleó también un estudio clínico de diseño abierto, pragmático, retrospectivo caso-control con un total de 726 individuos divididos en 2 cohortes: la cohorte de casos formada por 234 pacientes con diagnóstico de SAMG; y la cohorte control de 492 sujetos no afectados randomizados por sexo y edad de la base de datos anonimizada del Banc de Sang i Teixits de Barcelona versión 2017, que comprendía más de 2000 donantes españoles sanos de médula ósea (dos controles sanos por caso).

Los casos se seleccionaron de la cohorte global de MG (n=269) de nuestra Unidad. Inicialmente, se excluyeron las formas familiares autoinmunes (FAMG) así como los casos en los que se había confirmado genéticamente el diagnóstico de un síndrome miasténico congénito (CMS). Además, se excluyeron 12 pacientes de etnia no caucásica (10 casos de origen hispano, 2 de origen africanos) con el objetivo de homogeneizar la cohorte y evitar sesgos debidos a diferentes orígenes étnicos.

La población final del estudio, tipificada para los alelos y haplotipos HLA, era por lo tanto de origen caucásico en su totalidad, incluyendo 234 casos de miastenia gravis autoinmune esporádica (SAMG).

3.2.4. Estudio de prevalencia de mutaciones en el gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG

Se incluyeron 16 casos de FAMG y 77 casos de miastenia gravis autoinmune esporádica (SAMG) para el estudio de la prevalencia de las mutaciones del gen ENOX1 en nuestra población MG.

El ADN purificado de los pacientes fue amplificado para la región terminal del exón 17 y la región 3'UTR del gen ENOX1 y secuenciado para obtener el genotipo de los pacientes. Las frecuencias fueron comparadas con las frecuencia depositadas en las bases de datos dbSNP (caucásicos) y 1000 Genomas (Población ibérica, IBS).

3.2.5. Estudio caso-control para el análisis de variantes genéticas del gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG

Se diseñó un estudio clínico con diseño pragmático, caso-control y retrospectivo. La muestra analizada estaba compuesta de 343 pacientes con MG autoinmune (incluidas formas familiares y esporádicas) y 598 controles no afectados de enfermedad neurodegenerativa y de iguales características demográficas que los pacientes de MG, procedentes del Banco Nacional de ADN (1.7 controles por caso), emparejados por edad y sexo de forma aleatoria para cada caso, con el objetivo de analizar el riesgo de enfermedad.

Se clasificaron las muestras de los pacientes en 5 grupos: (1) FAMG+SAMG; (2) sólo SAMG, (3) sólo FAMG, (4) sólo EOMG (incluyendo FAMG+SAMG) y (5) sólo LOMG+VLOMG (incluyendo FAMG+SAMG).

Para cada uno de los grupos analizados, se investigaron las siguientes variables: (1) riesgo de enfermedad (MG), (2) edad de debut de la MG, (3) categoría de debut (EO, LO o VLO), (4) debut temprano vs debut muy tardío (EO vs VLO), (5) debut temprano vs debut tardío y muy tardío (EO vs LO+VLO), (6) debut temprano vs controles jóvenes, (7) debut muy tardío vs controles edad avanzada, (8) debut tardío y muy tardío vs controles edad intermedia y avanzada, (9) MGFA al debut, (10) MGFA clase I al debut, (11) presencia de timoma, (12) timectomía, (13) presencia de hiperplasia tímica y (14) presencia de anticuerpos contra AChR.

3.3. Análisis estadísticos en FAMG, SAMG y controles

3.3.1. Análisis comparativo de los grupos FAMG, SAMG y control

Los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1, o sus haplotipos, se usaron como predictores de debut temprano de MG o EOMG y para el riesgo de enfermedad. Los datos demográficos y clínicos se expresan en forma de media, desviación estándar, rango, intervalos de confianza del 95% para las variables continuas y en forma de valores absolutos y porcentaje para las variables categóricas.

Las frecuencias de ocurrencia de los alelos HLA individuales o combinados en el grupo FAMG, se compararon con las frecuencias de estos alelos en los grupos SAMG y control respectivamente.

Las asociaciones para cada alelo, las odds ratios y los intervalos de confianza del 95% se calcularon usando el software SPSS 21.0 (IBM Inc.) y el OR calculator (www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). La corrección de Bonferroni para dos alelos se empleó para corregir por múltiples comparaciones. Un valor de p menor de 0.025 se consideró estadísticamente significativo. Los datos se presentan como recuento alélico (n alelos), frecuencias alélicas, valores de odds ratio e intervalos de confianza del 95%.

3.3.2. Análisis HLA en formas esporádicas de MG (SAMG)

Los genotipos y haplotipos HLA se utilizaron como predictores de riesgo para desarrollar miastenia gravis, la edad de debut, la clase MGFA al debut, el desarrollo de hiperplasia tímica o timoma, el estatus inmunológico (presencia o ausencia de anticuerpos anti-AchR o anti-MuSK) o la combinación de variables (variables combinadas o mixed variables).

El análisis estadístico descriptivo se realizó mediante el uso de Graphpad (<http://www.graphpad.com/quickcalcs>). El paquete estadístico The Bridging ImmunoGenomic Data-Analysis Workflow Gaps (BIGDAWG) R package version 1.3.7 (<http://bigdawg.immunogenomics.org>) [Pappas 2016] se utilizó para analizar las frecuencias alélicas empleando un modelo caso-control. Se obtuvieron así las frecuencias para el test de la chi-cuadrado (χ^2) y las correspondientes odds ratios, los intervalos de confianza de 95% y los p-valores para cada alelo y haplotipo. Asimismo, se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) con el test exacto de Fisher, implementado en el mismo paquete BIGDAWG. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p de 0,01 o menor después de ajustar por comparaciones múltiples (multiple test comparisons or MTc).

El tamaño muestral y el poder estadístico se calcularon usando el software Quanto [Gauderman 2006]. Este estudio tenía un valor estadístico previo de 80% (alfa=5%) para detectar una diferencia de OR>1.4 en el riesgo de sufrir MG (menor frecuencia alélica= 0.23 para B*08:01) entre casos y controles.

3.3.3. Análisis mutacional del gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG

Los genotipos y/o los haplotipos de ENOX1 rs7338624, rs703206, rs703207, rs1044753 se utilizaron como predictores de riesgo para sufrir MG, la clase MGFA al debut o la edad al debut.

Las asociaciones para cada SNP, las odds ratio y los intervalos de confianza del 95% (IC) se analizaron computacionalmente usando modelos lineales generalizados (tanto para rasgos cuantitativos como binarios) e implementados en el paquete SNPAssoc del Software R [González 2007].

Los análisis se realizaron siguiendo 5 modelos de herencia distintos: dominante, recesivo, aditivo, superdominante (overdominant) y codominante.

Se escogió el mejor modelo mediante los criterios de Akaike (Akaike Information Criteria) (AIC) y se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) usando el test exacto de Fisher, implementado en el paquete SNPAssoc.

Los análisis de marcadores simples y haplotipos se realizaron ajustando por sexo según la necesidad y estratificados topográficamente por la forma de debut clínico. Se utilizó la corrección de Bonferroni para 4 SNPs para corregir por múltiples comparaciones. Se aplicó asimismo un factor adicional de corrección de 2.5 para corregir el uso de 5 modelos genéticos distintos [González 2007, Vidal-Taboada 2018]. Usando estos criterios, el nivel de significación estadística no corregido utilizado fue de $p < 0.0077$. Se muestran los p-valores no corregidos y corregidos. La regresión logística ordinal para el análisis de las variables categóricas (p.ej. QMG, MGFA, edad inicio) de la enfermedad se calculó mediante el software SPSS.

El análisis de marcadores simples en relación al riesgo de enfermedad se calcularon mediante el uso de regresión logística en R (paquete SNPAssoc). El análisis de haplotipos de los SNPs ENOX1 se llevó a cabo usando el paquete Haplo de SNPAssoc.

3.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica de pacientes (casos) y controles, se realizó mediante los protocolos de *salting out* adaptados [Miller 1988] o bien usando el kit comercial de Qiagen cuando el volumen de las muestras era menor de 3-5 mL.

3.4.1. Protocolo de extracción de ADN mediante salting out

A partir de muestras de 5-10 mL sangre periférica congelada en tubos EDTA, se procedió a la extracción de ADN, de acuerdo a cada uno de los siguientes pasos:

- **Lisis de hematíes.** Una vez descongeladas a T^a ambiente, se transfirió cada una de las muestras de sangre a un tubo falcon de 50 cc. Se preparó la solución de lisis de hematíes y se añadió a la muestra hasta un volumen final de 45 cc, agitándose manualmente hasta homogeneizar. Posteriormente, se dejaron los tubos en nevera 30 minutos para facilitar la lisis y a continuación se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm a 4°C. Se invirtió suavemente cada uno de los tubos una sola vez, comprobando que el sedimento (“*pelet*”) de leucocitos no se desprendía y seguidamente se descartó el sobrenadante decantando. Se añadió al *pelet* la solución de lisis de hematíes hasta llegar a 45 cc, agitando manualmente hasta homogeneizar y centrifugando nuevamente durante 15 minutos a 3500 rpm a 4°C. Como en el paso anterior, se invirtió suavemente cada tubo una sola vez, comprobando que el *pelet* de leucocitos no se desprendía, antes de volver a descartar el sobrenadante decantando.
- **Digestión de proteínas.** Se añadió a cada *pelet*: 3 ml de solución de lisis de leucocitos (WCLB), 200 µl de SDS 10% y 500 µl de solución de proteinasa K, agitando con vórtex hasta homogeneizar. Posteriormente, se incubaron las muestras en agitación a 37°C en el baño de agua durante un mínimo de 12 h.
- **Extracción de ADN.** Después de dejar enfriar las muestras, se añadió a cada tubo 1 ml de NaCl saturado 5,5M, agitando con vórtex, y se dejaron las muestras en nevera de 20 a 30 minutos. Seguidamente, se centrifugaron 15 minutos a 3500 rpm a 4°C. se traspasó el sobrenadante a un segundo tubo falcon de 50 cc; se volvió a centrifugar 15 min a 3500 rpm a 4°C y se traspasó de nuevo el sobrenadante a un tercer tubo falcon. Finalmente, se añadió 1 volumen/volumen (V/V) de cloroformo en campana de flujo y se agitó enérgica y manualmente cada tubo durante 15 segundos y se centrifugaron 20 minutos a 3500 rpm a 4°C. Después, con una pipeta, se traspasó la fase superior a un cuarto tubo falcon, se añadió a cada muestra 2V/V de etanol absoluto frío y se agitó suavemente cada tubo por inversión hasta que apareció la medusa de ADN. La medusa se recogió con la punta de una pipeta, se lavó por inmersión en etanol al 70% y se colocó en un tubo estéril (libre de DNAsa y RNAsa) y se dejó abierto hasta conseguir que se evaporar el etanol residual. Después, se añadió buffer TE al ADN (200-500 µl de volumen según la medida de la medusa) y se dejaron las muestras en agitación a 37°C durante unas horas.
- **Cuantificación de la concentración ADN:** Para ello se utilizó el nanodrop, intentando que el ADN se encontrara entre 200-400 ng/µl. Se guardaron las muestras anonimizadas y codificadas a -20 °C o a -80 °C.

3.4.2. Protocolo de extracción de ADN mediante kit comercial Qiagen

Este protocolo se desarrolló siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ADN a partir de sangre periférica completa QIAamp DNA Blood Mini kit, spin protocol (from the QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 05/2016, Qiagen) (figura 18). Todos los pasos de centrifugación se realizaron a temperatura ambiente (15-25°C). Las muestras y los reactivos antes de empezar el protocolo también se encontraban a temperatura ambiente (15-25°C).

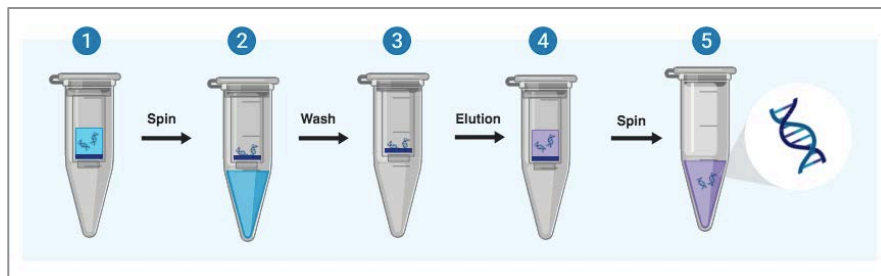


Figura 18. Representación esquemática de los pasos a seguir durante el protocolo de extracción de ADN.

Se pipeteó 20 µl de proteasa QIAGEN (o proteinase K) en el fondo de un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, al que se añadieron posteriormente 200 µl de muestra de sangre periférica y 200 µl de Buffer AL (Qiagen), agitando con vórtex cada tubo durante 15 segundos. Se incubaron los tubos a 56°C durante 10 minutos y seguidamente se centrifugaron brevemente los tubos para eliminar las posibles gotas depositadas en la tapa. Se añadió 200 µl de etanol (96–100%) a la muestra, agitando con vórtex cada tubo durante 15 segundos. Después de mezclar, de nuevo se centrifugaron brevemente los tubos para eliminar las posibles gotas depositadas en la tapa.

A continuación, se añadió la mezcla a la columna (QIAamp Mini spin column, Qiagen), colocada en un tubo recogida de 2 ml, evitando humedecer el aro, cerrando la tapa y centrifugando a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Después se colocó cada columna en un tubo de recogida de 2 ml limpio, eliminando el tubo que contenía el filtrado.

Se añadió a cada columna 500 µl de Buffer AW1 (Qiagen) y se centrifugaron a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto, colocando una vez más la columna QIAamp Mini spin column en un tubo de 2 mL limpio, eliminando el tubo que contenía el filtrado. Posteriormente, se añadió 500 µl de Buffer AW2 (Qiagen) a cada columna y se centrifugaron a 20.000 x g

(14.000 rpm) durante 3 minutos. Se colocó de nuevo la columna en un tubo limpio de 2 mL, descartando el filtrado y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto.

Para finalizar, se colocó de nuevo la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se descartó el tubo con el filtrado, añadiendo 200 µl de Buffer AE (Qiagen) e se incubó a temperatura ambiente (15–25°C) durante 5 minutos, centrifugando luego durante 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm).

A posteriori, se procedió a la cuantificación de la concentración ADN mediante espectrofotometría (Nanodrop), y se guardaron las muestras anonimizadas y codificadas a -20 °C o a -80 °C.

3.5. Análisis del genotipo HLA

3.5.1. Análisis HLA en formas familiares de MG (FAMG)

3.5.1.1. Genotipado de alta resolución de HLA-DRB1 y -DQB1

A partir de las muestras de sangre periférica obtenidas de los casos familiares y esporádicos de miastenia gravis autoinmune, así como de los controles sanos, se procedió a la extracción y purificación de las muestras de ADN, mediante el kit QIAasymphony DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). El kit QIAasymphony es otra versión comercial automatizada del QIAamp® DNA Mini Kit.

Posteriormente, se realizó un genotipado de alta resolución (4 dígitos) de los alelos HLA-DRB1 y DQB1, usando la técnica de Sequence Based Typing con el kit theAlleleSEQR (Abbott Molecular, Celera Corporation, CA, USA). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador capilar modelo ABI373 utilizando el BigDye H Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Para la tipificación de los alelos se empleó el software Assign SBT (Conexio Genomics, Applecross, Australia). Las ambigüedades se resolvieron teniendo en cuenta el genotipo más probable basándonos en las frecuencias alélicas reportadas en población caucásica [Maier, 2007].

3.5.1.2. Genotipado de alta resolución de HLA mediante secuenciación NGS

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los 234 pacientes con miastenia gravis autoinmune, que se utilizaron para la extracción y purificación de ADN mediante el kit QIAAsymphony DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA).

Se realizó el genotipado de alta resolución de los alelos de clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) y clase II (HLA-DRB1 and HLA-DQB1) usando la secuenciación masiva por técnicas de Next Generation Sequencing (NGS). Se desarrolló una PCR long range [Wilton 2002] multiplex de protocolo propio (in-house) con el objetivo de amplificar la longitud completa de los genes de ese loci [Rudilla 2015].

Posteriormente, se procedió a unir un tag específico (tagmentar) al ADN genómico, amplificarlo y prepararlo para la preparación normalizada de librerías de ADN, de acuerdo con las especificaciones descritas en el esquema de trabajo de Nextera XT DNA workflow (Illumina, San Diego, CA).

La secuenciación se realizó en una plataformaS Illumina MiSeq usando la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) (Illumina, San Diego, CA). Los datos de las secuencias HLA obtenidas se analizaron con el software Omixon Target HLA (version 1.9.3, Hungary). Las secuencias obtenidas se compararon con la versión actualizada de IMGT HLA (www.ebi.ac.uk/imgt/hla).

3.6. Análisis del genotipo ENOX1

3.6.1. Análisis del gen ENOX1 por secuenciación Sanger

Inicialmente, se procedió a amplificar la región del gen ENOX1 a analizar mediante la reacción de PCR. Los cebadores (*primers*) para la PCR se diseñaron para amplificar la región final del exón 17 y la primera porción de la región 3'-UTR del gen ENOX1 (Primer3 versión 4.0): Forward 5'-CACGCATGTTCAAACAGGAA -3' y reverse 5'-ACTTACAAGAGAACGCCACA -3'. La mix de reacción empleada se detalla en la siguiente figura (figura 19).

Los ciclos de secuenciación siguieron el esquema: incubación 1 minuto a 96°C; 25 ciclos de 3 etapas (desnaturalización a T^a96°C durante 10 segundos, hibridación a T^a50°C durante 5 segundos y elongación a T^a60°C durante 4 segundos).

Después se purificaron los productos de PCR mediante el uso del kit comercial ExoSAP-IT PCR-Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific, Inc.) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Para ello, se retiró el reactivo ExoSAP-IT™ del congelador a -20°C, se colocó en hielo y se mezclaron 5 µL del producto de PCR con 2µL de reactivo ExoSAP-IT™. Se incubaron durante 15 minutos a 37°C para degradar posibles *primers* y nucleótidos residuales y posteriormente a 15 minutos a 80°C para inactivar ExoSAP-IT™.

Component	Standard reaction (20 µL)		
	Quantity per reaction	Example Forward	Example Reverse
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	8 µL	8 µL	8 µL
Forward primer (3.2 µM)	3.2 pmol	2 µL	—
Reverse primer (3.2 µM)		—	2 µL
Deionized water (RNase/DNase-free)	Varies based on template and primer volume	8 µL	8 µL
Template	See "Template quantity" on page 12	2 µL ^{[1], [2]}	2 µL ^{[1], [2]}
Total volume	20 µL	20 µL	20 µL

Figura 19. Descripción de los componentes, volúmenes y concentraciones que constituyen la mix de Macrogen, Inc para la secuenciación Sanger.

Seguidamente, se inició la secuenciación de ADN por el método Sanger utilizando el BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems. ThermoFisher Scientific, Inc.) en el secuenciador ABI3730XL DNA Analyzer. Se mezclaron 10 µL de producto de PCR purificado a 50 ng/µL con 3 µL del *primer* (2µM) de secuenciación en sentido *forward*. Otra reacción de secuenciación se realizó utilizando 3 µL de *primer reverse*. Las dos mezclas para secuenciar fueron enviadas a Macrogen, Inc para su secuenciación.

Por último, se realizó la secuenciación de los productos de PCR purificados utilizando el BigDye XTerminator™ Purification kit, siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante en el BigDye XTerminator™ Purification Kit Protocol (Pub. No. 4374408; Macrogen, Inc) y a la electroforesis capilar en el 3730XL DNA Analyzer (*Macrogen, Inc*), usando el Dye set Z, POP-7 y una longitud de capilar de 50 cm. El análisis de secuencias se llevó a cabo con el software FinchTV Version 1.5.0 (Geospiza, Inc.). Las secuencias obtenidas se compararon

con la secuencia de referencia de ENOX1 (GenBank entry NM_017993; Ensembl ID ENST00000261488.10).

3.6.2. Análisis del gen ENOX1 por genotipado KASPar

Los alelos ENOX1 rs7338624, rs703206, rs703207, rs1044753 se genotiparon mediante el uso del sistema KASPar® SNP Genotyping system (LGC Genomics, KBioscience, UK) de acuerdo con los procedimientos estándar del fabricante (figura 20). El ensayo KASP es una herramienta tecnológica de genotipado que permite un estudio dirigido y específico de los SNP (targeting). KASP consiste en 2 primers alelo-específicos competitivos en secuencia forward y un *primer* común en secuencia reverse que utiliza el sistema de fluorescencia FRET (del inglés *fluorescent resonance energy transfer*).

Cada *primer* forward incorpora una secuencia adicional en 5' que corresponde a uno de los dos *primers* universales marcados fluorescentemente y un “quencher” presentes en la mezcla de reacción (figura 20). Estos FRET (marcador fluorescente + quencher) están apagados y no dan señal hasta el segundo ciclo de PCR, cuando se genera una de las colas alelo-específicas debido a la presencia de uno (o dos) de los alelos. Entonces, la parte del *primer*-casete FRET marcada se libera de la molécula que inhibe la fluorescencia (*quencher*), dando lugar a una señal fluorescente diferente (FAM o Hex) para cada uno de los alelos.

Las variantes del gen ENOX1 fueron identificadas después de la amplificación con su set de *primers* correspondiente (rs7338624_C: GCA GCC ATC ATC TGA GGA AGC, rs7338624_G: GCA GCC ATC ATC TGA GGA AGG, rs7338624_com: GTA GAT GCA GGT GGA GTT GAG AAC AT , rs703206_G: GAG GTG TGG GGT TGG TCCC, rs703206_T: GGA GGT GTG GGG TTG GTC CA. rs703206_com: TCG ATG GCT CCA CAA AGG TTG YGT, rs703207_A: GTA GTT TTA ATT CCT TCA AAG GCA CAC AA, rs703207_G: AGT TTT AAT TCC TTC AAA GGC ACA CAG, rs703207_com: GAA TTC ACG GGT GTG GGA GCC A, rs1044753_C: CGA TGG CTC CAC AAA GGT TGC, rs1044753_T: CGA TGG CTC CAC AAA GGT TGT, rs1044753_com: GGA AGC AGG AGG TGT GGG GTT).

La fluorescencia se midió a 25°C en un sistema de PCR Real time 7300 (Applied Bioscience). La tipificación del genotipo (genotype calling) se realizó usando el sistema 7300 system SDS software v1.4 (Applied Bioscience) y el software Klustercaller (KBioscience, UK).

Para la reacción, se mezclaron 3,9 µl de una alícuota de ADN a 5 ng/µl con 4 µl de la mix KASPar reaction y 0,1 µl de la mix de sondas (que contenía los *primers* alelo-

específicos). Las muestras codificadas en placas de 96 pocillos se colocaron en el termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA).

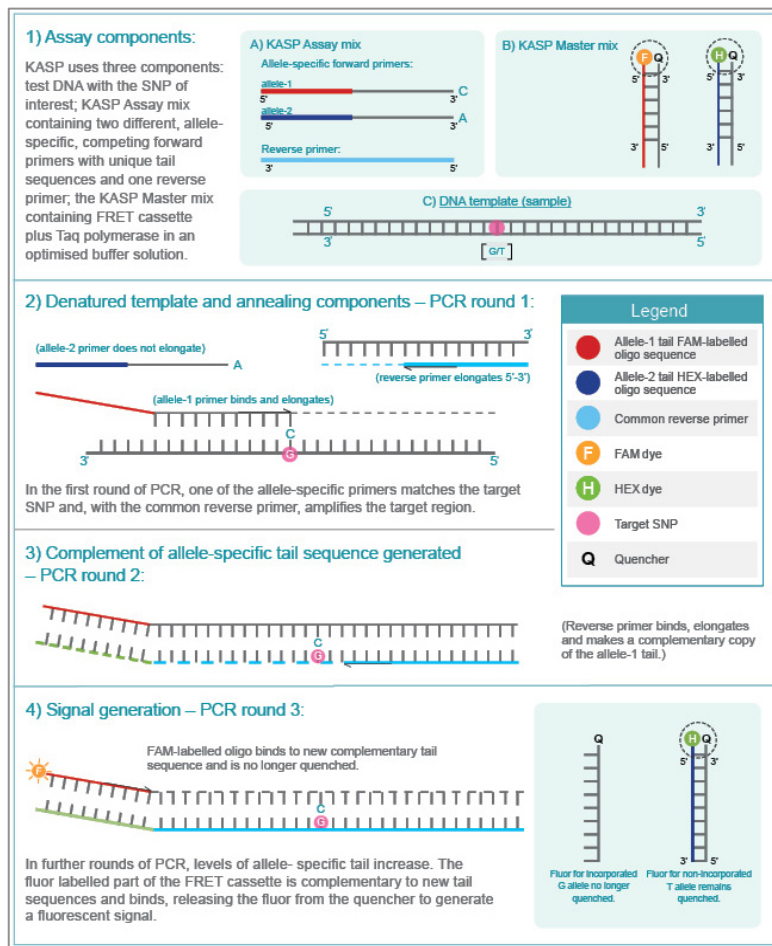


Figura 20. Diseño esquemático de un ensayo KASP general (reproducido con permiso del fabricante).

El programa del termociclador siguió este esquema: activación Hot-start (94°C durante 15 minutos), 20 ciclos (a 94°C durante 10 segundos y 57°C durante 5 segundos), más 18 ciclos (72°C durante 10 segundos, 94°C durante 10 segundos y 57°C durante 20 segundos) y una fase final de elongación (72°C durante 40 segundos). Las señales de fluorescencia se leyeron a 25°C (FAM 485/520 nm y VIC 520/570 nm).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de prevalencia de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española

Entre los 462 pacientes monitorizados por MG en nuestra Unidad, pudimos identificar 8 pedigrís no relacionados, que comprendían 16 pacientes con MG y 2 individuos asintomáticos a lo largo de 1 o 2 generaciones. Las características demográficas de los pacientes y sus familiares se encuentran resumidas en la tabla (tabla 1). La población de FAMG era de origen caucásico en su totalidad.

La distribución por género incluía 11 (68.8%) mujeres y 5 (31.3%) hombres, con una media de edad de debut de 59.44 ± 29.35 (rango 23–82) y una media de tiempo de seguimiento de 10.69 ± 10.2 años.

Las formas de debut LOMG y VLOMG (81.2%) conformaban el fenotipo de presentación más común en nuestra serie, comparado con las formas EOMG (18.8%). La distribución funcional según la clasificación MGFA al debut fue la siguiente: seis formas oculares (37.5%), cuatro formas IIa (25.0%), cuatro IIb (25.0%), una IIIa (6.25%) y una IIIb (6.25%).

En 13 de los 16 pacientes se detectaron anticuerpos contra el receptor de acetilcolina (AChR) (81.2%), que eran negativos en 2 pacientes (12.5%). 14 de los 16 pacientes se testaron para los anticuerpos contra MuSK, pero ninguno resultó positivo. Siete pacientes fueron sometidos a timectomía.

El estudio anatómico-patológico era compatible con timoma en dos casos (28.6%) e hiperplasia en cinco (71.4%). Los resultados de las pruebas radiológicas del caso 18 eran muy sugestivas de timoma, pero la situación respiratoria comprometida de este paciente, hizo desestimar la cirugía torácica.

Se detectó la presencia de otras enfermedades autoinmunes en 9 individuos pertenecientes a 6 familias no relacionadas. Tres pacientes presentaban hipotiroidismo, uno había sido diagnosticado de un síndrome de Sjögren, otro tenía una diabetes tipo 1, otro vitíligo, otro psoriasis y el último sufría una celiaquía.

Uno de los pacientes se encontraba estable sin ningún tipo de tratamiento farmacológico. Quince de los 16 casos (93.7%) se encontraban en tratamiento con

Piridostigmina oral, siete (43.8%) con Prednisona (PR) y siete (43.8%) requerían un inmunosupresor de segunda línea. De estos, un paciente recibía Prednisona combinada con Micofenolato Mofetilo (MMo) y los seis restantes (37.5%) estaban en tratamiento con una combinación de Tacrolimus y otro inmunosupresor: PR (n=3), Azatioprina (AZA; n=1), PR y AZA (n=1) y MMo (n=1).

Respecto al estatus post-intervención (PIS), once de los 16 pacientes (68.8%) fueron clasificados a la categoría de *minimal manifestations* (MM) de la enfermedad, uno de ellos mejoró (6.3%; en remisión o *remitting*), uno estaba en situación de remisión clínica completa (CSR) y dos pacientes habían empeorado (12.5%). Sólo uno de los pacientes con MG refractaria requirió de ingreso a la Unidad de Cuidados intensivos, y resultó exitus a raíz de una infección oportunistas en el contexto de su inmunosupresión crónica por la MG (familia 6, caso 13) (figura 21).

Los resultados de este trabajo se publicaron en 2016 y el artículo original se adjunta en el Anexo 1 de este proyecto de tesis.

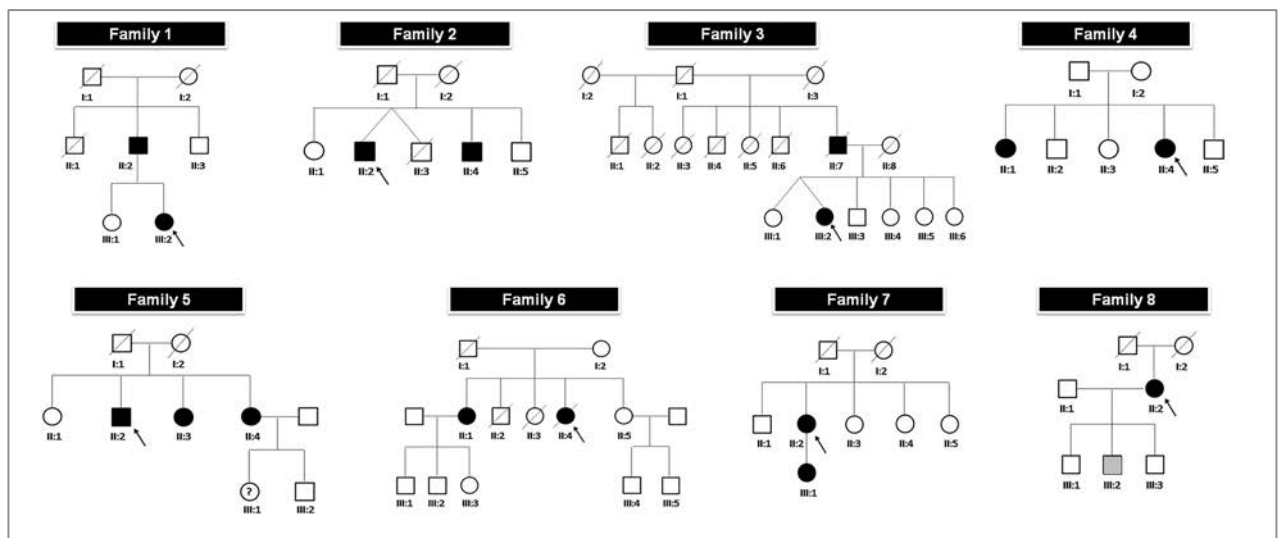


Figura 21. Pedigrís de las familias de miastenia gravis incluidas en el estudio.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune

Familia	Caso	Relación	Sexo	Edad al debut (años)	Edad en la última visita (años) y estado actual	Clasificación por edad debut	MGFA debut	Duración (años)	QMG más alto	Tímectomía	Histología	Anti-ACHR	Anti-MuSK	Otras enfermedades autoinmunes
1	1	Padre	H	81	88 SIMP	VLOMG	I	7	ND	NO	ND	N	N	NO
	2	Hija	M	50	54 SIMP	LOMG	I	4	5	NO	ND	P	N	Celiacquia
2	3	Hermano	H	67	79 SIMP	VLOMG	I	12	5	NO	ND	P	N	Vitiligo
	4	Hermano	H	69	73 SIMP	VLOMG	I	4	ND	NO	ND	P	N	NO
3	5	Padre	H	62	80 EX ^(*)	LOMG	IIb	18	ND	NO	ND	ND	ND	NO
	6	Hermana (gemelas)	M	59	67 SIMP	LOMG	IIb	8	4	NO	ND	P	N	NO
	7	Hermana (gemelas)	M	ND	67 ASIMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	N	NO
4	8	Hermana	M	33	40 SIMP	EOMG	IIa	7	5	SI	Hi	P	N	Hipotiroidismo
	9	Hermana	M	31	36 SIMP	EOMG	IIa	5	10	SI	Hi	P	N	Diabetes Mellitus tipo 1
5	10	Hermana	M	58	87 SIMP	LOMG	IIa	29	14	SI	Hi	P	N	Hipotiroidismo
	11	Hermano	H	50	89 SIMP	LOMG	IIa	39	5	SI	T	P	N	NO
	12	Hermana	M	77	81 SIMP	VLOMG	I	4	10	NO	ND	N	N	Hipotiroidismo
6	13	Hermana	M	54	64 EX ^(*)	LOMG	IIb	10	21	SI	T	P	N	Diabetes Mellitus tipo 2
	14	Hermana	M	69	75 SIMP	VLOMG	I	6	18	SI	Hi	P	N	Síndrome de Sjögren
7	15	Madre	M	59	63 SIMP	LOMG	IIla	4	16	NO	ND	N	N	NO
	16	Hija	M	23	36 SIMP	EOMG	IIb	13	14	SI	Hi	P	N	NO
8	17	Madre	M	82	83 SIMP	VLOMG	IIb	1	8	NO	ND	P	ND	NO
	18	Hijo ^(*)	H	ND	61 ASIMP	ND	ND	ND	ND	NO	ND	P	N	Psoriasis

Abreviaturas: ASIMP=asintomático; EOMG= miastenia debut precoz o early onset myasthenia gravis; EX=éxito; H=hombre; HI=hiperplasia; LOMG= miastenia debut tardío o late onset myasthenia gravis; M=mujer; ND=no disponible; P=positivo; QMG= puntuación máxima en el quantitative myasthenia gravis test; SIMP=sintomático; T=timoma; VLOMG= miastenia de debut muy tardío o very late onset myasthenia gravis. §=éxito por insuficiencia respiratoria a la edad de 80 años; ¶=éxito debido al empeoramiento del estado de la miastenia e infección oportunista a los 64 años; φ=paciente con diagnóstico radiológico de timoma, pero sin síntomas clínicos de MG.

4.2. Estudio del rol de los alelos HLA-DRB1 y DQB1 en las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española

4.2.1. Caracterización clínica

El presente estudio complementa el trabajo previo: 'Estudio de prevalencia de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española' descrito en el apartado anterior. Se utilizó el mismo grupo de pacientes con formas familiares de miastenia gravis autoinmune, analizando datos demográficos, clínicos, histopatológicos e inmunológicos, así como la distribución de los alelos HLA-DRB1 y DQB1 para cada paciente con FAMG.

A diferencia del estudio anterior, en este caso, se excluyó del análisis al padre de la familia 3 (II-7), debido que no se pudo realizar estudio de HLA en este paciente (muestra no disponible). Por otro lado, el hijo de la familia 8 (III-2), si se incluyó en el análisis, considerando el interés potencial del caso, ya que muy probablemente habría desarrollado miastenia gravis clínicamente evidente, pero que no pudo completar su seguimiento evolutivo siendo exitus antes de concluir este estudio. Los datos demográficos, clínicos, histopatológicos e inmunológicos de la muestra FAMG, se resumen en la [tabla 2](#).

4.2.2. Resultados del genotipado de alta resolución de HLA-DRB1 y DQB1

El alelo DRB1*03:01 estaba presente de 6 casos (37.5%, frecuencia alélica: 0.1875), seguido de DRB1*01:01 (25%, frecuencia alélica: 0.125) y DRB1*13:01 (18.75%, frecuencia alélica: 0.09375). El alelo DQB1*02:01 también se detectó en 6 pacientes (37.5%, frecuencia alélica:0.1875), junto a DQB1*05:01 (25%, frecuencia alélica:0.25) y DQB1*05:03 (25%, frecuencia alélica: 0.125).

La co-ocurrencia de los alelos HLA-DRB1*03:01 y DQB1*02:01 en un mismo individuo fue la combinación más común en nuestra cohorte. Cinco pacientes eran portadores de estos dos alelos (31.25%). Además, la gemela no afecta de la familia 3, también era portadora de los alelos DRB1*03:01 y DQB1*02:01 ([tabla 2](#)).

4.2.3. Análisis comparativo de los grupos FAMG, SAMG y control

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las características demográficas de los grupos de FAMG y SAMG ([tabla 3](#)).

El alelo HLA-DQB1*05:03 era más común en el grupo de FAMG (0.125) que en el grupo control (0.010). Esta diferencia nominal era estadísticamente significativa, con un efecto OR de 13.57 (95%CI [1.46 - 126.40]; $p=0.022$, $\text{adj-}p=0.44$), pero no superó la corrección estadística de multiple test. No se observaron diferencias para este alelo entre los grupos de FAMG y SAMG. El resto de alelos DQB1 no mostraron diferencias en su distribución entre los FAMG y los controles sanos, ni tampoco entre FAMG y SAMG (tabla 5).

Tampoco se detectaron diferencias estadísticas para los alelos DRB1 en ninguno de los grupos (FAMG, SAMG o controles). No obstante, el alelo DRB1*14:54 presentaba una tendencia estadística (OR=9.83, 95%CI [0.98-98.13], $p=0.052$) como un posible factor de riesgo para MG (tabla 4).

Tabla 2. Características demográficas, clínicas y distribución HLA-DRB1/DQ1 de las formas familiares de MG autoinmune

Familia	Caso	Relación	Edad y Sexo	Edad debut (años)	Clasificación por edad debut	MGFA debut	Herencia	Histología Timo	Anti-AchR	Anti-MuSK	ALELOS HLA DRB1	ALELOS HLA DQB1
1	1 (II:2)	Padre	91/H	81	VLOMG	I	AD	ND	N	N	DRB1*01:02	DQB1*05:01
	2 (III:2)	Hija	57/M	50	LOMG	I	AD	ND	P	N	DRB1*01:02	DQB1*05:01
2	3 (II:2)	Hermano	82/H	67	VLOMG	I	AR	ND	P	N	DRB1*14:54	DQB1*05:02
	4 (II:4)	Hermano	75/H	69	VLOMG	I	AR	ND	P	N	DRB1*14:54	DQB1*05:02
3	5 (III:2)	Hermana (gemelas)	69/M	59	LOMG	IIb	AD	ND	P	N	DRB1*03:01	DQB1*02:01
	6 (III:1)	Hermana (gemelas)	67/M/DEC ^v	ND	ND	ND	AD	ND	N	N	DRB1*03:01	DQB1*02:01
	7 (II:1)	Hermana	43/M	33	EOMG	IIa	AR	Hi	P	N	DRB1*03:01	DQB1*02:01
4	8 (II:4)	Hermana	38/M	31	EOMG	IIa	AR	Hi	P	N	DRB1*03:01	DQB1*02:01
	9 (II:3)	Hermana	89/M	58	LOMG	IIa	AR	Hi	P	N	DRB1*04:01	DQB1*02:01
5	10 (II:2)	Hermano	92/H	50	LOMG	IIa	AR	T	P	N	DRB1*03:01	DQB1*03:01
	11 (II:4)	Hermana	83/M	77	VLOMG	I	AR	ND	N	N	DRB1*03:01	DQB1*02:01
6	12 (II:4)	Hermana	64/M/DEC [*]	54	LOMG	IIIb	AR	T	P	N	DRB1*01:01	DQB1*05:01
	13 (II:1)	Hermana	77/M	69	VLOMG	I	AR	Hi	P	N	DRB1*03:01	DQB1*02:01
7	14 (II:2)	Madre	66/M	59	LOMG	IIIa	AD	ND	N	N	DRB1*13:01	DQB1*06:02
	15 (III:1)	Hija	38/M	23	EOMG	IIb	AD	Hi	P	N	DRB1*13:01	DQB1*06:03
8	16 (II:2)	Madre	86/M	82	VLOMG	IIb	AD	ND	P	ND	DRB1*01:03	DQB1*05:01
	17 (III:2)	Hijo ^v	64/H/DEC ^v	ND	ND	ND	AD	ND	P	N	DRB1*11:01	DQB1*03:01

Abreviaturas: ASIMP=asintomático; AD=autosómico dominante; AR=autosómico recesivo; EOMG= miastenia debut precoz o early onset myasthenia gravis; EX=éxito; H=hombre; HI=hiperplasia; LOMG= miastenia debut tardío o late onset myasthenia gravis; M=mujer; N=negativo; ND=no disponible; P=positivo; QMG= puntuación máxima en el quantitative myasthenia gravis test; SIMP=sintomático; T=timoma; VLOMG= miastenia de debut muy tardío o very late onset myasthenia gravis. §=éxito por insuficiencia respiratoria a la edad de 80 años; †=éxito debido al empeoramiento del estado de la miastenia e infección oportunista a los 64 años; φ=paciente con diagnóstico radiológico de timoma, pero sin síntomas clínicos de MG.

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de las formas familiares (FAMG) y esporádicas (SAMG) de miastenia gravis autoinmune y controles sanos en el estudio de los alelos HLA DR/DQB1

	FAMG			SAMG			CONTROLES		
	TOTAL (n=16)	M (n=11)	H (n=5)	TOTAL (n=32)	M (n=22)	H (n=10)	TOTAL (n=48)	M (n=33)	H (n=15)
EDAD	Media±DE	69,63±18,19	64,55±18,73	80,80±11,69	66,94±17,67	77,50±10,41	41,15±3,70	40,73±3,46	42,07±4,15
	Rango	38-92	38-89	64-92	35-88	60-88	36-51	36-48	39-51
	IC 95%	59,93-79,32	51,96-77,13	66,28-95,32	60,57-73,31	54,0-70,28	70,06-84,94	40,07-42,22	39,50-41,95
EDAD DEBUT	Media±DE	57,75±17,38	54,09±18,84	65,80±11,26	55,00±22,64	71,20±14,37			
	Rango	23-82	23-82	50-81	19-86	48-86			
	IC 95%	48,49-67,01	41,43-66,75	51,82-79,78	46,84-63,16	60,92-81,48			
FORMA DEBUT	EOMG(%)	3(18,75)	3(27,27)	0(0)	10(31,25)	10(45,45)	0(0,0)		
	LOMG(%)	6(37,5)	5(45,45)	1(20)	8(25,0)	5(22,73)	3(30,0)		
	VLOMG(%)	6(37,5)	3(27,27)	3(60)	14(43,75)	7(31,82)	7(70,0)		
HISTOLOGÍA	TIMOMA	2	1	1	2	1	1		
	HIPERPLASIA	5	5	0	5	5	0		
	NORMAL	0	0	0	5	5	0		
AChR-Ab	Positivo	13(81,25)	9(81,82)	4(80,0)	24(75,0)	15(68,18)	9(90,0)		
	I	6(37,5)	3(27,27)	3(60,0)	11(34,38)	7(31,82)	4(40,0)		
	IIA	4(25,0)	3(27,27)	1(20,0)	11(34,38)	7(31,82)	4(40,0)		
MGFA DEBUT	IIB	3(18,75)	3(27,27)	0(0,0)	5(15,63)	4(18,18)	1(10,0)		
	IIIA	1(6,25)	1(9,09)	0(0,0)	1(3,13)	1(4,55)	0(0,0)		
	IIIB	1(6,25)	1(9,09)	0(0,0)	2(6,25)	1(4,55)	1(10,0)		
	IVA	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)		
	IVB	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(6,25)	2(9,09)	0(0,0)		
	V	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)		

Abreviaturas: DE= desviación estándar; IC 95%= intervalo de confianza 95%; EOMG= miastenia debut precoz o early onset myasthenia gravis; H=hombre; LOMG= miastenia debut tardío o late onset myasthenia gravis; M=mujer; VLOMG= miastenia de debut muy tardío o very late onset myasthenia gravis; AChR-Ab=anticuerpos contra el receptor de acetilcolina.

Tabla 4A. Frecuencias alélicas HLA-DRB1 en FAMG, SAMG y controles y resultados de los análisis comparativos

ALELOS DRB1	FAMG			CONTROLES			FAMG VS CONTROLES			SAMG			FAMG VS SAMG		
	n alelos	frecuencia alélica	p	n alelos	frecuencia alélica	p	OR	IC 95%	p	n alelos	frecuencia alélica	p	OR	IC 95%	p
DRB1*01:01	3	0,09375	0,744	10	0,10417	0,744	1,2286	0,3571-4,2264	0,744	5	0,078125	0,744	1,221	0,2727-5,4643	0,7943
DRB1*01:02	3	0,09375	0,6315	4	0,04167	0,6315	1,5333	0,2673-8,7948	0,6315	2	0,03125	0,6315	3,2069	0,5079-20,2482	0,2152
DRB1*01:03	2	0,0625	0,4383	3	0,03125	0,4383	2,0667	0,3296-12,9602	0,4383	1	0,015625	0,4383	4,2000	0,3662-48,1654	0,2489
DRB1*03:01	6	0,1875	0,3816	12	0,125	0,3816	1,6154	0,5518-4,7292	0,3816	8	0,125	0,3816	1,6154	0,5083-5,1335	0,4162
DRB1*04:01	1	0,03125	0,1777	0	0	0,1777	9,1905	0,3651-231,3672	0,1777	2	0,03125	0,1777	1,0000	0,0873-11,4605	1,0000
DRB1*04:02	0	0	0,7286	2	0,02083	0,7286	0,5815	0,0272-12,4334	0,7286	0	0	0,7286	1,9846	0,0385-102,3127	0,7333
DRB1*04:03	0	0	0,5882	0	0	0,5882	2,9692	0,0577-152,6894	0,5882	3	0,046875	0,5882	0,2703	0,0135-5,3949	0,3917
DRB1*04:04	0	0	0,2984	6	0,0625	0,2984	0,2142	0,0117-3,9096	0,2984	3	0,046875	0,2984	0,2703	0,0135-5,3949	0,3917
DRB1*04:05	1	0,03125	0,4333	1	0,01042	0,4333	3,0645	0,1861-50,4630	0,4333	0	0	0,4333	6,1429	0,2433-155,1183	0,2705
DRB1*04:07	0	0	0,5882	0	0	0,5882	2,9692	0,0577-152,6894	0,5882	2	0,03125	0,5882	0,3846	0,0179-8,2511	0,5413
DRB1*07:01	1	0,03125	0,0974	15	0,15625	0,0974	0,1742	0,0221-1,3752	0,0974	6	0,09375	0,0974	0,3118	0,0359-2,7079	0,2907
DRB1*08:01	0	0	0,7286	2	0,02083	0,7286	0,5815	0,0272-12,4334	0,7286	3	0,046875	0,7286	0,2703	0,0135-5,3949	0,3917
DRB1*08:13	0	0	0,5882	0	0	0,5882	2,9692	0,0577-152,6894	0,5882	0	0	0,5882	1,9846	0,0385-102,3127	0,7333
DRB1*09:01	0	0	0,99	1	0,01042	0,99	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	1	0,015625	0,99	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946
DRB1*10:01	0	0	0,56	3	0,03125	0,56	0,411	0,0207-8,1728	0,56	1	0,015625	0,56	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946
DRB1*11:01	1	0,03125	0,4132	7	0,07292	0,4132	0,4101	0,0485-3,4680	0,4132	4	0,0625	0,4132	0,4839	0,0518-4,5172	0,5242
DRB1*11:02	0	0	0,99	1	0,01042	0,99	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	1	0,015625	0,99	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946
DRB1*11:04	2	0,0625	0,2637	2	0,02083	0,2637	3,13	0,4229-23,2133	0,2637	3	0,046875	0,2637	1,3556	0,2149-8,5510	0,7461
DRB1*11:18	0	0	0,99	1	0,01042	0,99	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	0	0	0,99	1,9846	0,0385-102,3127	0,7333
DRB1*12:01	0	0	0,56	3	0,03125	0,56	0,411	0,0207-8,1728	0,56	2	0,03125	0,56	0,3846	0,0179-8,2511	0,5413
DRB1*12:02	0	0	0,99	1	0,01042	0,99	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	0	0	0,99	1,9846	0,0385-102,3127	0,7333

Factores genéticos que influyen en las formas familiares y esporádicas de miastenia gravis autoinmune

Tabla 4B. Frecuencias alélicas HLA-DRB1 en FAMG, SAMG y controles y resultados de los análisis comparativos (continuación)

ALELOS DRB1	FAMG			CONTROLES			FAMG VS CONTROLES			SAMG			FAMG VS SAMG		
	n alelos	frecuencia alélica	n alelos	frecuencia alélica	n alelos	IC 95%	OR	IC 95%	p	n alelos	frecuencia alélica	OR	IC 95%	P	
DRB1*13:01	3	0,09375	7	0,07292	1,3153	0,3192-5,4195	0,7044	1	0,7044	1	0,015625	6,5172	0,6498-65,3662	0,111	
DRB1*13:02	0	0	3	0,03125	1	0,103-9,9685	1	6	0,09375	0,1385	0,0076-2,5373	0,1827	0,0076-2,5373	0,1827	
DRB1*13:03	1	0,03125	4	0,04167	0,3162	0,0166-6,0360	0,4442	0	0	6,1429	0,2433-155,1183	0,2705	0,2433-155,1183	0,2705	
DRB1*13:05	0	0	0	0	2,9692	0,0577-152,6894	0,5882	1	0,015625	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946	0,0258-16,4389	0,7946	
DRB1*13:06	0	0	1	0,01042	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	0	0	1,9846	0,0385-102,3127	0,7333	0,0385-102,3127	0,7333	
DRB1*14:01	1	0,03125	0	0	9,1905	0,3615-231,3672	0,1777	0	0	6,1429	0,2433-155,1183	0,2705	0,2433-155,1183	0,2705	
DRB1*14:54	3	0,09375	1	0,01042	9,8276	0,9842-98,1296	0,0516	3	0,046875	2,1034	0,3998-11,0657	0,3800	0,3998-11,0657	0,3800	
DRB1*15:01	2	0,0625	4	0,04167	1,5333	0,2673-8,7948	0,6315	4	0,0625	1,0000	0,1732-5,7723	1,0000	0,1732-5,7723	1,0000	
DRB1*15:02	0	0	1	0,01042	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	0	0	1,9846	0,0385-102,3127	0,7333	0,0385-102,3127	0,7333	
DRB1*15:03	0	0	0	0	2,9692	0,0577-152,6894	0,5882	1	0,015625	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946	0,0258-16,4389	0,7946	
DRB1*16:01	0	0	1	0,01042	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	1	0,015625	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946	0,0258-16,4389	0,7946	
DRB1*16:02	2	0,0625	0	0	15,8197	0,7391-388,6095	0,0773	0	0	10,5738	0,4924-227,0548	0,1317	0,4924-227,0548	0,1317	

Tabla 5. Frecuencias alélicas HLA-DQB1 en FAMG, SAMG y controles y resultados de los análisis comparativos

Alelos DQB1	FAMG			CONTROLES			FAMG VS CONTROLES			SAMG			FAMG VS SAMG		
	n alelos	frecuencia alélica	p	n alelos	frecuencia alélica	p	OR	IC 95%	p	n alelos	frecuencia alélica	p	OR	IC 95%	p
DQB1*02:01	6	0,1875	0,3816	12	0,125	0,3816	1,6154	0,5518-4,7292	0,3816	8	0,125	0,4162	1,6154	0,5083-5,1335	0,4162
DQB1*02:02	1	0,03125	0,1611	12	0,125	0,1611	0,2258	0,0282-1,8096	0,1611	5	0,078125	0,3875	0,3806	0,0426-3,4034	0,3875
DQB1*03:01	4	0,125	0,493	17	0,17708	0,493	0,6639	0,2058-2,1420	0,493	12	0,1875	0,4415	0,619	0,1825-2,0996	0,4415
DQB1*03:02	1	0,03125	0,2782	9	0,09375	0,2782	0,3118	0,0379-2,5625	0,2782	8	0,125	0,1698	0,2258	0,0270-1,8901	0,1698
DQB1*03:03	0	0	0,4442	4	0,04167	0,4442	0,3162	0,0166-6,0360	0,4442	2	0,03125	0,5413	0,3846	0,0179-8,2511	0,5413
DQB1*03:19	0	0	0,5882	0	0	0,5882	2,9692	0,0577-152,6894	0,5882	1	0,015625	0,7946	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946
DQB1*04:02	0	0	0,7286	2	0,02083	0,7286	0,5815	0,272-12,4334	0,7286	3	0,046875	0,3917	0,2703	0,0135-5,3949	0,3917
DQB1*05:01	8	0,25	0,6219	20	0,20833	0,6219	1,2667	0,4950-3,2414	0,6219	9	0,140625	0,1909	2,0370	0,7013-5,9167	0,1909
DQB1*05:02	2	0,0625	0,4383	3	0,03125	0,4383	2,0667	0,3296-12,9602	0,4383	3	0,046875	0,7461	1,3556	0,2149-8,5510	0,7461
DQB1*05:03	4	0,125	0,022	1	0,01042	0,022	13,5714	1,4571-126,4032	0,022	3	0,046875	0,1810	2,9048	0,6089-13,8565	0,1810
DQB1*06:01	0	0	0,99	1	0,01042	0,99	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	0	0	0,7333	1,9846	0,0385-102,3127	0,7333
DQB1*06:02	2	0,0625	0,4383	3	0,03125	0,4383	2,0667	0,3296-12,9602	0,4383	4	0,0625	1,0000	1,0000	0,1732-5,7723	1,0000
DQB1*06:03	3	0,09375	0,8556	8	0,08333	0,8556	1,1379	0,2829-4,5764	0,8556	1	0,015625	0,111	6,5172	0,6498-65,3662	0,111
DQB1*06:04	1	0,03125	1,0000	3	0,03125	1,0000	1,0000	0,1003-9,9685	1,0000	3	0,046875	0,7198	0,6559	0,0655-6,5693	0,7198
DQB1*06:09	0	0	0,5882	0	0	0,5882	2,9692	0,0577-152,6894	0,5882	1	0,015625	0,7946	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946
DQB1*06:52	0	0	0,5882	0	0	0,5882	2,9692	0,0577-152,6894	0,5882	1	0,015625	0,7946	0,6513	0,0258-16,4389	0,7946
DQB1*31:09	0	0	0,99	1	0,01042	0,99	0,9795	0,0389-24,6455	0,99	0	0	0,7333	1,9846	0,0385-102,3127	0,7333

4.3. Estudio de alelos y haplotipos HLA en una población española de miastenia gravis autoinmune esporádica

Las características demográficas detalladas de los casos y los controles, así como de las variables estudiadas y de los subgrupos de pacientes se resumen en la siguiente tabla (tabla 6).

Tabla 6. Datos demográficos y variables principales de estudio

		CONTROLES	TOTAL casos MG	EOMG	LOMG	VLOMG
n=726		492	234	79	85	70
edad (años)	media ± DE	46,94±6,02	63,06±16,05	47,22±13,45	64,84±8,80	78,80±5,36
	IC 95%	46,41-47,47	61,00-65,13	44,20-50,23	62,94-66,73	77,52-80,08
	Rango	20-55	20-89	20-80	45-85	68-89
edad debut (años)	media ± DE		50,40±21,02	25,48±8,97	53,96±7,30	74,26±5,21
	IC 95%		47,69-53,12	23,47-27,49	52,38-55,55	73,01-75,50
	Rango		3-86	3-40	41-65	66-86
Sexo	hombre (%)	220(44,7)	107(45,7)	13(16,5)	53(62,4)	41(58,5)
	mujer (%)	272(55,3)	127(54,3)	66(83,5)	32(37,6)	29(41,4)
timectomía (n, %)			106(45,3)	62(78,5)	40(47,1)	4(5,7)
histopatología timo (n, %)	normal/atrofia		20 (18,8)	8(12,9)	11(27,5)	1(25,0)
	hiperplasia		41(38,7)	32(51,6)	7(17,5)	2(50,0)
	timoma		30(28,3)	9(14,5)	20(50,0)	1(25,0)
	ND		15(14,2)	13(21,0)	2(5,0)	0(0)
estatus serológico (n, %)	anti-AChR		172(73,5)	62(36,0)	61(35,5)	49(28,5)
	anti-MuSK		7(3,0)	5(71,4)	2(28,6)	0(0)
	doble seronegativo		40(17,1)	6(15,0)	19(47,5)	15(37,5)
	AChR neg_MuSK_ND		14 (6,0)	5(35,7)	3(21,4)	6(42,9)
	ND		1(0,4)	1(100,0)	0(0)	0(0)
otras EAI (n, %)*			66(28,2)	20(30,3)	27(40,9)	19(28,8)

*Porcentaje de casos EOMG, LOMG o VLOMG con otras enfermedades autoinmunes (EAI) calculados sobre el total de casos MG; DE: desviación estándar; IC95%: Intervalo de confianza al 95%; ND: no disponible.

En segundo término, los pacientes SAMG se dividieron en dos grupos de acuerdo a sus resultados de cirugía tímica y hallazgos histopatológicos (tabla 7). Un total de 30 pacientes con MG y timoma se analizaron y compararon con el resto de casos con hiperplasia tímica, timo normal o atrófico y no timectomizados (n=204). Adicionalmente, se estratificaron los diferentes grupos de los fenotipos MG por género.

Tabla 7. Demografía del estudio en pacientes MG con timoma y sin timoma

		TOTAL casos MG	TIMOMA	NO TIMOMA
N		234	30	204
edad (años)	media ± DE	63,06±16,05	60,47±9,18	63,45±16,81
	IC 95%	61,00-65,13	57,04-63,90	61,13-65,77
	Rango	20-89	47-79	20-89
edad debut (años)	media ± DE	50,40±21,02	46,03±12,64	51,05±21,94
	IC 95%	47,69-53,12	41,31-50,75	48,01-54,09
	Rango	3-86	15-67	3-86
Sexo	hombre(%)	107(45,7)	11(36,7)	96(47,1)
	mujer(%)	127(54,3)	19(63,3)	108(52,9)
MGFA al debut	I(%)	78(33,3)	5 (16,7)	73(35,8)
	Ila(%)	61(26,1)	11(36,7)	50(24,5)
	Ilb(%)	48(20,5)	6(20,0)	42(20,6)
	IIla(%)	14(6,0)	3(10,0)	11(5,4)
	IIlb(%)	19(8,1)	2(6,7)	17(8,3)
	IVa(%)	2(0,9)	1(3,3)	1(0,5)
	IVb(%)	10(4,3)	1(3,3)	10(4,9)
	V(%)	2(0,9)	1(3,3)	1(0,5)

4.3.1. Análisis caso-control

En nuestra serie, las frecuencias de 13 de los alelos HLA estudiados mostraron diferencias significativas entre casos y controles. Después de ajustar los valores de significación estadística utilizando la corrección por test múltiples (*multiple test comparisons* o *MTc*), los alelos A*01:01, B*08:01, DRB1*03:01, DRB1*14:54, DQB1*02:01, DQB1*05:02 y DQB1*05:03 actuaban como factores de riesgo, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (tabla 8). Paralelamente, basándonos en el hecho de que la mayoría de las variantes genéticas del complejo HLA se encuentran en desequilibrio de ligamento, se realizó un análisis de haplotipos, que demostró que el haplotipo A1-B8-C7-DR3-DQ2 era el más frecuente entre los casos con MG (14.1% respecto a los controles 4.5%; OR 3.32, IC95%[1.85-6.04]), mostrando una tendencia a la significación estadística (p=0.07, tabla 8).

Los alelos HLA-B*08:01, C*07:01, DRB1*03:01 y DQB1*02:01 presentaban una distribución diferente entre hombres y mujeres. HLA-A*01:01, B*08:01, C*07:01, DRB1*03:01 y DQB1*02:01 se comportaban como factores de riesgo para el subgrupo de las mujeres, propiciando la aparición de MG, mientras que HLA-A*24:02 lo hacía como factor protector en este mismo subgrupo.

También observamos que los alelos HLA-DQB1*05:02, *05:03 y *06:03, mostraban una tendencia a la significación estadística, actuando como factores de riesgo para MG en mujeres (tabla 8). No pudimos identificar ningún alelo ni ningún haplotipo HLA como factor de riesgo o protección en el subgrupo de hombres con MG.

4.3.2. Análisis por grupos fenotípicos de MG

4.3.2.1. Según la edad debut de la MG

Comparando los pacientes con un inicio temprano de los síntomas (EOMG) con la suma de pacientes con un debut tardío (LOMG+VLOMG) (figura 22), pudimos identificar los alelos A*01:01, B*08:01, C*07:01, DRB1*03:01, DQB1*02:01 y *05:02 como los más comunes en pacientes EOMG (inicio hasta los 40 años de edad) (tabla 9). Por el contrario, HLA-B*07:02, DQB1*02:02 y C*07:02 jugaban un papel protector contra el debut temprano y eran más prevalentes entre los individuos que presentaban un debut tardío (>40 años). Otros alelos, incluyendo el DRB1*07:01, el DQB1*05:01 y el DRB1*01:01 también mostraban una tendencia en la misma dirección, pero no lograron superar la significación estadística después del MTC.

En un análisis simultáneo en que comparábamos los dos grupos de pacientes con edades de debut más extremas (EO vs VLOMG), obtuvimos resultados similares en cuanto a los factores de riesgo A*01:01, C*07:01 y B*08:01. Respecto a los factores protectores, de nuevo, HLA-DQB1*02:02 (45.7% vs 17.0%; OR=0.31, IC95%[0.15-0.63], p=0.0004) y también DRB1*07:01 (47.1% vs 19.3%; OR=0.35, IC95[0.17-0.68], p=0.0008) eran más comunes en el grupo de pacientes VLOMG.

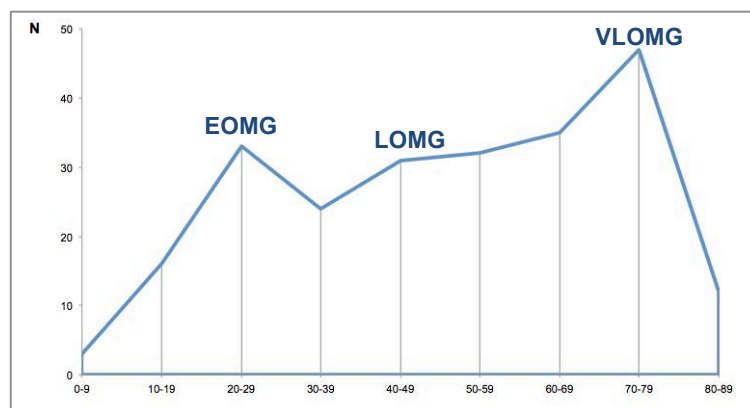


Figura 22. Distribución por grupos de edades de debut y subgrupos según edad de debut de la enfermedad de los pacientes con MG analizados como casos en este estudio.

Por otro lado, el haplotipo A1-B8-C7-DR3-DQ2 también fue identificado como un factor de riesgo significativo para un inicio temprano de la MG en las dos comparaciones descritas previamente: 1.EOMG vs LO+VLOMG (OR 3.31; IC95% [1.51-7.45], $p=0.0007$) (tabla 9) y 2.EOMG vs VLOMG (OR 6.52; IC95% [1.89-34.6], $p=0.0007$).

4.3.2.2. Según la forma de presentación y la clasificación funcional MGFA

El alelo HLA-DQB1*05:03 demostró ser un factor protector en los individuos con miastenia gravis de debut ocular (MGFA clase I) (OR=0.19, 95%CI [0.02-0.8], $p=0.01$), siendo más habitual en casos con MG generalizada de inicio. No se pudieron identificar factores de riesgo HLA para formas de inicio ocular o generalizado en nuestra serie (tabla A5).

4.3.2.3. Según el fenotipo serológico

En pacientes con anticuerpos contra el receptor de acetilcolina (AChR+), HLA-DQB1*02:02 mostraba una tendencia a la significación estadística, que no se mantuvo después de aplicar el MTc (OR=2.08, 95%CI [1.03-4.53], $p=0.03$).

4.3.2.4. Según el fenotipo anatomopatológico del timo

Comparando los individuos con MG, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de timoma, no se encontraron factores de riesgo ni protección asociados a ninguno de los dos grupos.

4.3.2.5. Análisis de variables fenotípicas combinadas: según la edad de debut de la MG, el fenotipo serológico y el fenotipo anatomopatológico del timo

Las mujeres con miastenia de debut temprano (EOMG), hiperplasia tímica y AChR+ ($n=21$) se podían diferenciar claramente del resto de casos de MG, que incluían todos los casos excepto las mujeres EOMG con hiperplasia tímica y AChR+ ($n=213$).

Nuestro análisis indicó que los alelos B*08:01 (OR=3.61, IC95%[1.6-7.75], $p=0.0002$), C*07:01 (OR=2.83, IC95%[1.35-5.78], $p=0.002$) y DQB1*03:01 (OR=2.7, IC95%[1.18-5.81], $p=0.006$) eran factores de riesgo para este fenotipo concreto en este grupo de pacientes con MG (tabla 10).

En cambio, no detectamos diferencias comparando los grupos de MG de debut tardío (LOMG y/o VLOMG) con timoma y con el resto de casos de MG ni con los grupos de EOMG e hiperplasia tímica.

Tabla 8. Resultados del análisis caso-control comparando las frecuencias de los alelos y haplotipos HLA entre: 1. Casos de SAMG vs controles y 2. Casos de mujeres SAMG (Ca_M) vs mujeres controles sanos (Co_M).

ALELO HLA	Casos SAMG vs controles				Casos SAMG vs controles (sólo mujeres)					
	ca_%	co_%	OR	IC 95%	P	ca_M_%	co_M_%	OR	IC 95%	P
A*01:01	28,6	19,9	1,51	1,07-2,13	0,01	34,9	21,0	1,81	1,15-2,81	0,006
B*08:01	25,6	10,6	2,64	1,75-3,97	0,0005	36,4	11,0	3,82	2,29-6,42	0,0001
C*07:01	39,3	23,0	1,89	1,38-2,57	0,3	51,2	23,5	2,58	1,73-3,85	0,007
DRB1*14:54	7,7	3,5	2,28	1,09-4,74	0,01					
DRB1*03:01	32,9	21,3	1,65	1,18-2,29	0,002	40,3	24,3	1,83	1,2-2,77	0,003
DQB1*02:01	32,9	21,7	1,61	1,16-2,24	0,003	40,3	24,6	1,8	1,18-2,72	0,003
DQB1*05:02	8,5	2,8	3,09	1,47-6,68	0,0008	7,8	2,6	3,09	1,05-9,68	0,02
DQB1*05:03	9,4	4,7	2,06	1,08-3,91	0,01	12,4	5,5	2,33	1,06-5,15	0,02
DQB1*06:03						19,9	5,9	3,64	1,85-7,35	0,02
A*24:02:00	13,7	21,7	0,6	0,39-0,92	0,01	10,1	23,5	0,4	0,2-0,75	0,002
B*35:08:00	0,4	3,0	0,14	0-0,91	0,03					
DRB1*07:01						21,7	32,7	0,62	0,38-0,99	0,04
DRB1*13:01	8,5	14,6	0,57	0,32-0,95	0,03					
DQB1*03:01	28,6	37,8	0,72	0,52-0,98	0,03					
DQB1*06:03	9,0	15,4	0,56	0,32-0,93	0,02					
HAPLOTIPO HLA	ca_%	co_%	OR	IC 95%	P	ca_%	co_%	OR	IC 95%	P
A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	14,1	4,5	3,32	1,85-6,04	0,07	20,2	5,9	3,7	1,87-7,52	0,2

En negrita: diferencias estadísticamente significativas después de ajustar por comparaciones múltiples (MTC).

Tabla 9. Resultados del análisis caso-control, comparando las frecuencias de alelos y haplotipos HLA entre los casos MG de debut temprano (EOMG) versus la suma de los casos de debut tardío y muy tardío (LO+VLOMG)

ALELO HLA	EOMG vs (LO+VLOMG)				
	EOMG_%	LO+VLOMG_%	OR	IC 95%	P
A*01:01	41,8	21,9	2,14	1,22 -3,74	0,004
B*08:01	46,8	14,8	3,82	2,1-7,01	0,01
C*07:01	58,2	29,7	2,36	1,44-3,85	0,0002
DRB1*03:01	48,1	25,2	2,2	1,3-3,72	0,002
DQB1*02:01	48,1	25,2	2,2	1,3-3,72	0,002
DQB1*05:02					
B*07:02	3,8	18,7	0,19	0,04-0,62	0,003
C*07:02	8,9	22,6	0,36	0,13-0,86	0,01
DRB1*01:01	7,6	17,4	0,41	0,14-1,05	0,05
DRB1*07:01	20,3	37,4	0,49	0,25-0,9	0,02
DQB1*02:02	17,7	35,5	0,45	0,22-0,86	0,01
DQB1*05:01	16,5	31,6	0,48	0,23-0,93	0,02
HAPLOTIPO HLA					
A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	EOMG_%	LO+VLOMG_%	OR	IC 95%	p
	32,0	8,4	3,31	1,51-7,45	0,0007

En negrita: diferencias estadísticamente significativas después de ajustar por comparaciones múltiples (MTc).

Tabla 10. Resultados del análisis caso-control, comparando las frecuencias de los alelos y haplotipos HLA entre el grupo de mujeres con MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica (HPL) y anti-AChR positivos vs el resto de casos de MG

MUJERES EOMG +HPL+anti-AChR (vs otras MG)					
ALELO HLA	EOW_H_AChR_%	RESTO MG_%	OR	IC 95%	p
B*08:01	61,9	22,1	3,61	1,6-7,75	0,0002
C*07:01	76,2	35,7	2,83	1,35-5,78	0,002
DRB1*03:01	76,2	28,6	3,68	1,73-7,59	0,7
DQB1*02:01	76,2	28,6	3,68	1,73-5,79	0,7
DQB1*03:01	57,1	25,8	2,7	1,18-5,81	0,006
C*04:01	4,8	28,6	0,15	0-0,9	0,03
DQB1*05:01	4,8	28,6	0,15	0-0,9	0,03

En negrita: diferencias estadísticamente significativas después de ajustar por comparaciones múltiples (MTC).

4.4. Estudio del gen ENOX1 como potencial factor de riesgo para las formas familiares de miastenia gravis en una cohorte española

4.4.1. Estudio mutacional del gen ENOX1: variante c.*35A>G e identificación de nuevas variantes

La variante c.*35A>G del gen ENOX1, situada en la región 3'-UTR, en el cromosoma 13q, reportada previamente en la literatura como un gen candidato para las formas familiares de miastenia gravis autoinmune (FAMG) [Landouré 2012], no se encontró en ninguna de las muestras de 16 pacientes con FAMG ni tampoco en nuestra cohorte de 77 casos de miastenia esporádica (SAMG) testados en nuestro laboratorio.

En cambio, se identificaron tres nuevas variantes de ENOX1 c.1900 C>T(rs 703207), c.*90A>C (rs703206) y c.*95A>G (rs1044753) en nuestra población (figura 23).

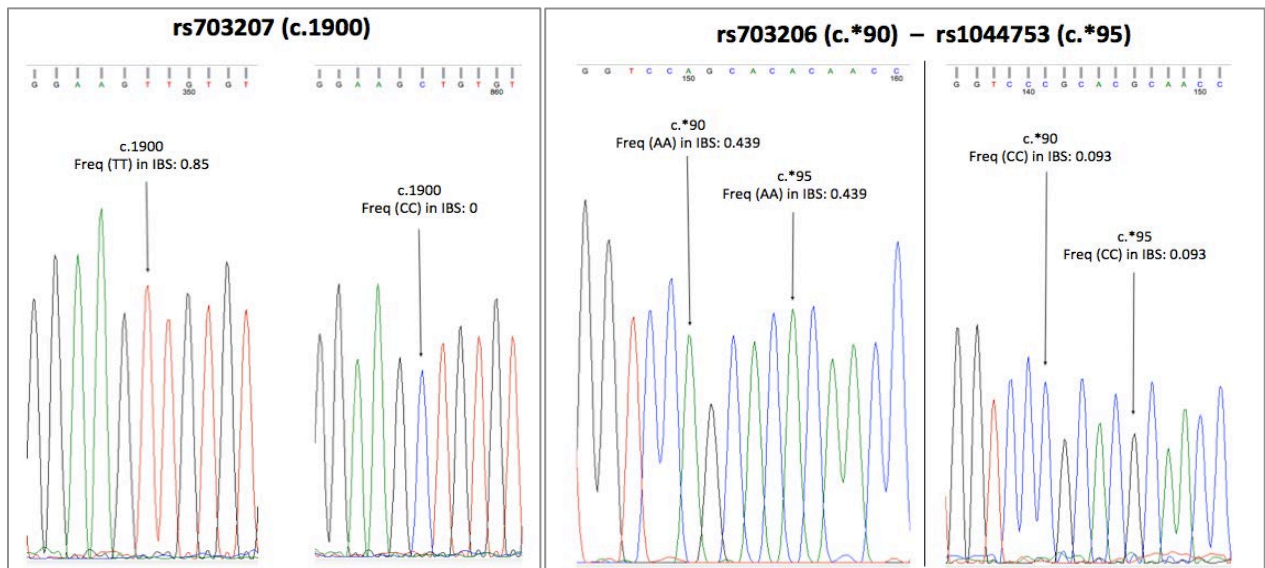


Figura 23. Polimorfismos (SNPs) detectados en el estudio del gen ENOX1 en nuestra población española de MG familiar (FAMG) y esporádica (SAMG) mediante secuenciación Sanger.

La variante c.1900C>T(rs 703207) se observó en 8 pacientes SAMG en homocigosis (frecuencia TT=0,782; CC=0,115; TC=0,101), pero no se encontró en ningún paciente FAMG en homocigosis (frecuencia TT=0,875; CC=0; TC=0,125).

La variante c.*90A>C (rs703206) se identificó en 21 pacientes SAMG en homocigosis (frecuencia CC=0,323; AA=0,2; AC=0,476) y en 6 FAMG (frecuencia CC=0,375; AA=0,5; AC=0,063).

Por último, la variante c.*95A>G (rs1044753) se observó en 62 pacientes SAMG (frecuencia GG=0,953; AA=0; AG=0,046) y en 8 FAMG (frecuencia GG= 0,5; AA=0,437; AG=0,062).

4.4.2. Estudio de asociación genética de variantes del gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG: resultados del análisis de variantes mediante KASPar

Con el objetivo de verificar si alguno de los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de ENOX1 c.1900 C>T(rs 703207), c.*90A>C (rs703206) y c.*95A>G (rs1044753), que habían sido detectados con una frecuencia superior a la descrita previamente en población ibérica teórica (IBS) podía actuar como factor de riesgo para la enfermedad en nuestra población de MG familiar y esporádica, diseñamos un estudio caso-control con una muestra poblacional mayor [n=343 casos de MG (incluidos SAMG y FAMG), 598 controles] y analizamos sus genotipos de los 3 SNPs mediante tecnología KASPar.

Una vez obtenidos los genotipos, estudiamos si los SNPs podían ser factores de riesgo para MG realizando un análisis de marcadores simples inicialmente y, posteriormente, por haplotipos para cada una de las variables descritas en el apartado anterior en cada grupo de pacientes. Se analizó también la variante rs7338624 identificada por ultrasecuenciación de 100 casos de MG en nuestro grupo.

4.4.2.1. Análisis de marcadores simples

En el grupo (4) sólo EOMG (incluyendo FAMG+SAMG), el análisis de marcadores simples evidenció que, en mujeres con MG de debut temprano, la variante rs1044753 podría actuar como factor de riesgo para un debut más tardío dentro del subgrupo de pacientes EOMG, bajo un modelo de herencia recesivo (tabla 11).

No se detectaron otras asociaciones significativas en este grupo de pacientes ni en ninguno de los otros grupos: (1) FAMG+SAMG, (2) sólo SAMG, (3) sólo FAMG y (5) sólo LOMG+VLOMG (incluyendo FAMG+SAMG), en referencia a ninguna de las variables incluidas en el estudio: (1) riesgo de enfermedad, (2) edad de debut, (3) categoría de debut (EO, LO o VLO), (3) comparaciones EO vs VLO, (4) comparaciones EO vs LO+VLO, (5) comparaciones EO vs controles jóvenes, (6) comparaciones VLO vs controles edad avanzada, (7) comparaciones LO+VLO vs controles edad intermedia y avanzada, (8) MGFA al debut, (9) MGFA clase I al debut, (10) timectomía, (11) timoma, (12) hiperplasia tímica ni (13) presencia de anticuerpos contra AChR (tabla 12).

Tabla 11. Resultados del análisis de marcadores simples de ENOX1 para la edad de inicio de los síntomas de MG bajo los 5 modelos de herencia analizados

Modelo Genético	Genotipos	N	Media	DE	OR	IC 95%	p-valor
Recesivo	T/T-T/C	49	26,73	1,148	7,765	2,53; 13,00	0,0052
	C/C	10	34,50	1,734			
Dominante	T/T	20	27,15	2,144	1,363	-3,07; 5,79	0,5489
	T/C-C/C	39	28,51	1,191			
SobreDominante	T/T-C/C	30	29,60	1,653	-3,152	-7,28; 0,98	0,1400
	T/C	29	26,45	1,289			
CoDominante	T/T	20	27,15	2,144	0,0		0,0197
	T/C	29	26,45	1,289	-0,701	-5,12; 3,72	
	C/C	10	34,50	1,734	7,350	1,46; 13,24	
Aditivo	0,1,2				2,915	-0,03 5,86	0,0570

Abreviaturas: N=muestra; DE=desviación estándar; IC95%=intervalo de confianza 95%

Tabla 12A. Resultados del análisis de marcadores simples del gen ENOX1 para las diferentes variables estudiadas

MODELO	Codominante	Dominante	Recesivo	SobreDominante	Aditivo
Riesgo de MG					
rs7338624	0,78549	-	-	-	-
rs703206	0,98716	0,88507	0,9837	0,87849	0,92883
rs703207	0,57436	0,79275	0,2923	0,95672	0,60492
rs1044753	0,95788	0,81932	0,91997	0,77024	0,91707
Edad de debut MG					
rs7338624	0,89767	-	-	-	-
rs703206	0,65288	0,80334	0,4511	0,43046	0,82928
rs703207	0,64683	0,35002	0,84585	0,3658	0,36182
rs1044753	0,73238	0,79571	0,54146	0,48268	0,89029
LO+VLOMG vs EOMG					
rs7338624	1	-	-	-	-
rs703206	0,83108	0,80246	0,54388	0,84779	0,62505
rs703207	0,58841	0,30955	0,97437	0,30391	0,34118
rs1044753	0,9251	0,80357	0,70875	0,97659	0,71376
VLOMG vs EOMG					
rs7338624	-	-	-	-	-
rs703206	0,82517	0,76487	0,54327	0,87406	0,59276
rs703207	0,58655	0,31191	0,96799	0,30383	0,35604
rs1044753	0,91485	0,76487	0,70734	0,99623	0,68214
LOMG vs EOMG					
rs7338624	1	-	-	-	-
rs703206	0,48479	0,35432	0,67191	0,22937	0,66784
rs703207	0,66722	0,5217	0,62911	0,43533	0,63025
rs1044753	0,54583	0,33453	0,86226	0,28676	0,56346
EOMG vs Controles					
rs7338624	1	-	-	-	-
rs703206	0,84796	0,92853	0,60839	0,65096	0,83678
rs703207	0,79638	0,50602	0,77082	0,55473	0,50193
rs1044753	0,96232	0,95095	0,8124	0,81704	0,9336
VLOMG vs Controles					
rs7338624	1	-	-	-	-
rs703206	0,87986	0,63034	0,76371	0,81666	0,62246
rs703207	0,72209	0,49167	0,81589	0,4319	0,58882
rs1044753	0,89485	0,6499	0,79127	0,81666	0,6499
LO+VLOMG vs Controles					
rs7338624	0,78488	-	-	-	-
rs703206	0,37884	0,18563	0,97377	0,2087	0,34526
rs703207	0,52391	0,92088	0,28101	0,67428	0,85096
rs1044753	0,32888	0,15556	0,96079	0,18063	0,30839

Tabla 12B. Resultados del análisis de marcadores simples del gen ENOX1 para las diferentes variables estudiadas

MODELO	Codominante	Dominante	Recesivo	SobreDominante	Aditivo
MGFA al debut					
rs7338624	0,0093	-	-	-	-
rs703206	0,48657	0,80133	0,23363	0,53893	0,42862
rs703207	0,80859	0,59457	0,63398	0,67163	0,54654
rs1044753	0,71487	0,73063	0,41354	0,79251	0,50685
MGFA I al debut (ocular)					
rs7338624	1	-	-	-	-
rs703206	0,99295	0,9572	0,93475	0,9112	0,99616
rs703207	0,89393	0,97688	0,63938	0,92789	0,89178
rs1044753	0,9558	0,92616	0,81285	0,7919	0,95338
Timectomía					
rs7338624	0,47059	-	-	-	-
rs703206	0,80092	0,50647	0,85882	0,59918	0,57723
rs703207	0,30087	0,13407	0,93334	0,12119	0,169
rs1044753	0,81439	0,5438	0,68618	0,76116	0,52825
Timoma					
rs7338624	1	-	-	-	-
rs703206	0,53628	0,2643	0,69377	0,4233	0,33339
rs703207	0,25623	0,06964	1	0,0942	0,25623
rs1044753	0,5175	0,25346	0,76891	0,36868	0,35396
Hiperplasia					
rs7338624	0,45652	-	-	-	-
rs703206	0,52831	0,27134	0,8664	0,33897	0,40296
rs703207	0,24965	0,51468	0,49833	0,21481	0,24965
rs1044753	0,58987	0,30515	0,64714	0,51139	0,35355
AChR positivos					
rs7338624	0,23744	-	-	-	-
rs703206	0,32262	0,64321	0,22444	0,20105	0,7864
rs703207	0,81495	0,47229	1	0,59608	0,81495
rs1044753	0,32252	0,71342	0,20603	0,21809	0,71296

Abreviaturas: EOMG= early onset MG o debut temprano; LOMG= Late Onset MG o debut tardío; VLOMG= Very Late Onset MG o debut muy tardío; MGFA= clasificación de la Myasthenia Gravis Foundation of America.

4.4.2.2. Análisis por haplotipos

En el grupo de pacientes (1) FAMG+SAMG, el análisis por haplotipos mostró que existen al menos 3 haplotipos diferentes (tabla 13) y que los portadores del haplotipo CGGC (rs7338624^C- rs703206^G - rs703207^G - rs1044753^C) presentaban una diferencia en la edad de inicio de la enfermedad de 21,10 años [IC95% (21,04-21,16); p=0] respecto al resto de haplotipos bajo un modelo de herencia recesiva (tabla 14).

Asimismo, el haplotipo CGAC (rs7338624^C-rs703206^G-rs703207^G-rs1044753^C) actuaría como un factor de riesgo para la presencia de timoma asociado a MG en este mismo grupo de pacientes con una OR 2,71 [IC95% (1,24-5,94); p=0,0128] según un modelo genético dominante (tabla 15).

Tabla 13. Haplotipos inferidos de la población de casos MG y controles y su frecuencia poblacional

	rs7338624	rs703206	rs703207	rs1044753	frecuencia haplotipo
Genotipo 1	C	G	A	C	0,288399
Genotipo 2	C	G	G	C	0,095322
Haplotipo base	C	T	A	T	0,611601

Tabla 14. Análisis de los haplotipos de ENOX1 para la edad de inicio de los síntomas de MG bajo los 3 modelos de herencia analizados

Modelo Genético	Haplotipo	Frecuencia	Diferencia	IC 95%	p-valor	p-valor modelo
Recesivo	CTAT	0,6116	51,90	Ref_haplo		1,06e-112
	CGAC	0,2884	2,16	-7,51; 11,82	0,6622	
	CGGC	0,0953	21,10	21,04 ; 21,16	0,0000	
Dominante	CTAT	0,6116	52,55	Ref_haplo		6,00e-121
	CGAC	0,2884	-1,88	-7,44; 3,68	0,5074	
	CGGC	0,0953	2,99	-4,15; 10,13	0,4122	
Aditivo	CTAT	0,6116	51,81	Ref_haplo		9,25e-111
	CGAC	0,2884	-0,52	-4,83 ; 3,79	0,8121	
	CGGC	0,0953	3,55	-3,36; 10,46	0,3143	

Abreviaturas: Ref_haplo=haplotipo de referencia

El resto de variables analizadas (forma de inicio, clasificación MGFA, etc) no demostraron asociaciones en ninguno de los grupos estudiados o bien los resultados no consiguieron superar la significación estadística tras ajustar por MTC.

Tabla 15. Análisis de los haplotipos de ENOX1 para la presencia de timoma asociado a MG bajo los 3 modelos de herencia analizados.

Modelo Genético	Haplotipo	Frecuencia	OR	IC 95%	p-valor	p-valor modelo
Recesivo	CTAT	0,6226	1,00	Ref_haplo		0,836
	CGAC	0,2741	1,02	0,28-3,73	0,9769	
	CGGC	0,0985	0,00	0,00-0,00	0,0000	
Dominante	CTAT	0,6226	1,00	Ref_haplo		0,00722
	CGAC	0,2741	2,71	1,24-5,94	0,0128	
	CGGC	0,0985	0,42	0,12; 1,46	0,1708	
Aditivo	CTAT	0,6226	1,00	Ref_haplo		9.25e-111
	CGAC	0,2741	1,65	0,96-2,84	0,0706	
	CGGC	0,0985	0,42	0,12-1,44	0,1676	

Abreviaturas: Ref_haplo=haplotipo de referencia

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Estudio de prevalencia de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española

En este estudio, se presentan los resultados de un estudio sobre la prevalencia y la caracterización clínica, serológica y anatomo-patológica de una población española con MG. En nuestra serie de 462 pacientes pudimos identificar 16 casos familiares pertenecientes a 8 familias no relacionadas. La prevalencia de FAMG en dicha serie ha sido del 3,46%, similar a la prevalencia publicada en otras poblaciones [Namba 1971, Marrie 2000, Landoure 2012, Pascuzzi 1986, Evoli 1995]. En países escandinavos, algunos autores han descrito frecuencias más elevadas, probablemente debido al hecho que los criterios de recogida de datos han sido tradicionalmente más rigurosos [Pirskanen 1977].

Hemos revisado PubMed buscando casos y series de FAMG donde se mencionaran expresamente la determinación de anti-AChR, anti-MuSK o ambos anticuerpos. Hemos encontrado alrededor de 20 familias de varias procedencias étnicas de todo el mundo, que incluían 50 pacientes de edades comprendidas entre los 12 y los 85 años. A pesar de que habitualmente las formas familiares de miastenia gravis se habían considerado de inicio temprano, en nuestra cohorte, pudimos observar un predominio claro de las formas de debut tardío o muy tardío. Estos resultados no son del todo sorprendentes, teniendo en cuenta que, en las últimas décadas, varios autores han reconocido un incremento significativo de los casos de debut tardío entre los pacientes con formas esporádicas de MG [Lanford 2009, Alkhawajah 2013].

Otra característica clínica que podría dificultar la identificación otros miembros afectados en la familia de un paciente, es que los individuos con FAMG presentan a menudo un curso clínico más lento y benigno. El debut tardío y la heterogeneidad inter y intrafamiliar fueron dos características comunes en nuestras familias. Así pues, pudimos observar un grado de variabilidad intrafamiliar destacable en el debut clínico en los individuos afectados de tres de nuestras familias (pedigrís 1, 5 y 7). Las otras cinco familias mostraban como rasgo común el inicio tardío o muy tardío (LOMG o LOMG) (pedigrís 2, 3, 5, 6 y 8). Los individuos afectados de una misma familia podían manifestar los síntomas de la enfermedad de forma temprana o tardía, ocular o generalizada (clase MGFA) y con diversos estatus post-intervención (PIS). En otras palabras, no se pudo establecer un fenotipo clínico estándar y distintivo para FAMG.

Uno de los ejemplos más claros de esta heterogeneidad, lo encontramos en la familia 6, formada por dos hermanas afectadas, que mostraron diferencias evidentes en cuanto a la gravedad de su enfermedad teniendo en cuenta la clase MGFA al debut y la progresión clínica. La hermana mayor (II:4) tenía una MG clase I al debut (69 años), con generalización a los 71 años y buena respuesta a Piridostigmina y dosis bajas de Prednisona oral. Su hermana pequeña (II:1) tenía una clase IIIb al inicio, con una respuesta escasa a varios inmunosupresores incluido el rituximab y presentó múltiples complicaciones en forma de crisis miasténicas graves e ingresos en UCI. En las dos hermanas se detectaron anticuerpos frente a AChR.

Esta variabilidad en formas familiares de MG también había sido publicada previamente en las familias más representativas que podemos encontrar en la literatura – el pedigrí británico de 3 generaciones reportado en 1982 [Honeybourne 1982], la familia húngara descrita en 1991 [Szobor 1991], las familias italianas recopiladas en 1998 [Evoli 1995], el extenso pedigrí canadiense estudiado en el 2000 [Marrie 2000] y las familias china e iraní publicadas en 2012 [Chen 2012, Rotstein 2012], que reflejan explícitamente esta heterogeneidad inter y intrafamiliar en el debut y la gravedad fenotípica de la MG [Gamez 2014].

En más de la mitad de nuestros pacientes, pudimos detectar anticuerpos contra AChR. No obstante, unos cuantos individuos obtuvieron valores negativos o límite (*borderline*) de estos anticuerpos. En estos casos, los estudios neurofisiológicos y el test de edrofonio nos ayudaron a poder confirmar la condición de afectado. Un análisis extensivo de las familias 1, 5 y 7 nos permitió identificar los individuos pertenecientes a una misma familia pero con estatus serológicos distintos (tabla 2). Algunos autores habían resaltado que la variabilidad fenotípica no sólo afectaba a los aspectos clínicos, sino que los individuos de una misma familia se podían diferenciar por sus resultados serológicos y/o por la presencia de alteraciones en el timo [Marrie 2000, Evoli 1995, Rotstein 2012, Provenzano 1988, Lavrnic 2008]. En una familia de Serbia, la madre tenía anticuerpos AChR positivos, su hija era positiva para anti-MuSK y seronegativa para anti-AChR [Lavrnic 2008]. Más recientemente, los autores de una publicación sobre una familia china, referían que la madre y la hija eran portadoras de anticuerpos contra AChR, mientras que el hijo padecía una miastenia doblemente seronegativa [Chen 2012].

En 9 casos pertenecientes a 6 de nuestras familias, se detectaron una o varias enfermedades autoinmunes concomitantes. Esta asociación es característica de las formas esporádicas de la enfermedad [Marrie 2000, Evoli 1995, Pirskanen 1977, Honeybourne 1982, Simpson 1964, Wright 1967, Nacu 2015].

Los resultados del estudio histológico en pacientes timectomizados mostraron la presencia de timoma en dos casos e hiperplasia tímica en cinco. Las frecuencias observadas en nuestras familias fueron similares a las de otras series [Rotstein 2012, Slowikowski 1968, Matani 1973, Wuketich 1983]. La agregación familiar en casos de timoma se describió por primera vez en 1968 [Slowikowski 1968, Matani 1973, Wuketich 1983]. Recientemente, se ha relacionado la coocurrencia de timoma y miastenia en una misma familia con una traslocación balanceada t(14;20), que se detectó en algunos de los individuos afectos en dos pedigrís no relacionados [Deminatti 1994, Nicodeme 2005].

En cuanto la caracterización clínico-genética, la distribución de los patrones de herencia en nuestra serie nos permitió identificar ambos patrones de transmisión autosómica recesiva y dominante en algunos pedigrís. Ambos patrones habían sido publicados previamente en la literatura [Szobor 1991, Bergoffen 1994]. No se habían descrito formas ligadas al cromosoma X. Se ha propuesto un posible fenómeno de anticipación en muchas familias con patrón dominante [Szobor 1991]. Szobor y col. también propusieron que la gravedad de la enfermedad aumentaba en cada generación.

La descendencia presentaba un debut más temprano que sus familiares afectos en dos de las familias de nuestra serie (pedigrís 1 y 7, figura 21).

Las relaciones intrafamiliares más frecuentes en nuestra serie fueron: hermana-hermana y hermano-hermana, seguidas de los familias con patrones de herencia sugestivos de ser autosómico dominante (ej. padre-hijo). La FAMG puede afectar a cualquier familiar independientemente del grado de parentesco [Namba 1971, Marrie 2000]. Es interesante prestar atención a la familia 3, en la cual, una de las mellizas desarrolló miastenia gravis, estando su padre también afectado.

De forma breve, podemos afirmar que FAMG es probablemente más frecuente de lo que tradicionalmente se había pensado. Ambos anticuerpos anti-AChR y anti-MuSK nos puede ayudar a caracterizar mejor a estos pacientes y así evitar la inclusión de formas congénitas en futuras series.

Los neurólogos con interés especial por la miastenia gravis deberían preguntar a sus pacientes miasténicos sobre la posibilidad de tener algún familiar afectado, para identificar mejor este particular subgrupo de pacientes, y especialmente aquellos miembros de la familia que refieran quejas de fatigabilidad y/o síntomas oculares, aunque los anticuerpos frente a AChR y MuSK fueran negativos. El fenotipo de FAMG es habitualmente indistinguible de las formas esporádicas de miastenia gravis autoinmune, y, en consecuencia, su tratamiento y manejo tendrían que ser superponibles en ambas situaciones.

Diversos factores genéticos podrían estar implicados en la aparición y el desarrollo de FAMG. Los resultados de un estudio GWAs realizado recientemente en una cohorte de MG con anti-AChR positivos sugirieron que la heredabilidad asociada a la MG juega un rol más significativo que el porcentaje de enfermedad familiar y de forma similar a lo que ocurre en otras enfermedades neurológicas, como la ELA o la enfermedad de Parkinson [Renton 2015].

Es necesario realizar estudios genéticos en poblaciones de todo el mundo para poder identificar factores de riesgo, susceptibilidad o modificantes de fenotipo en las formas esporádicas y familiares de MG autoinmune. Además, reconociendo a estos factores genéticos y epigenéticos que podrían actuar como factores modificantes de la expresión fenotípica, nos ayudaría a comprender mejor la variabilidad intra-familiar [Zagoriti 2013, Avidan 2014].

5.2. Estudio del rol de los alelos HLA-DRB1 y DQB1 en las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española

Este estudio reporta los resultados del análisis del rol de los alelos HLA-DRB1 y DQB1, como posibles factores de susceptibilidad de riesgo para FAMG y como posibles factores modificantes de fenotipo en una población española de MG. La prevalencia de FAMG en nuestra cohorte fue similar a las descritas previamente en otras series [Salvado 2016].

5.2.1. Análisis HLA en FAMG

En nuestra serie, cinco de los 16 pacientes FAMG (31.25%) eran portadores de ambos alelos DRB1*03:01 y DQB1*02:01.

La prevalencia individual de DRB103:01 y DQB102:01 en controles sanos (donantes de medula ósea) era de 20.83% (frecuencia alélica: 0.125). Estas frecuencias son comparables a las frecuencias descritas previamente en la literatura en donantes de sangre en el caso de DRB1*03:01(22.4%, frecuencia alélica: 0.12) [Vidal 2002] y en controles sanos en un estudio de esclerosis múltiple para el alelo DQB1*02:01 (25.6%, frecuencia alélica: 0.1374) en población española [Fernández 2008].

En una cohorte extensa de SAMG, de origen caucásico, los alelos DR3 (33% vs 19.5% en controles, RR 2.06) y DQB1*02:01 (47.2% vs 34.4% en controles, RR 1.70) se propusieron como factores de riesgo para la enfermedad [Vieira 1993]. Se han reportado frecuencias de DR3 y DQ2 en poblaciones de SAMG procedentes de Noruega o Túnez [Maniaol 2012, Fekih-Mrissa 2013].

En poblaciones caucásicas de MG, diferentes estudios de HLA han señalado la asociación entre HLA-DR3 y HLA-DQ2. También se ha reportado la asociación de variantes en estos dos genes con otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (RA), la enfermedad de Graves, el lupus eritematoso sistémico (LES), la enfermedad celíaca y la diabetes tipo 1 (DM1D) [Vandiedonck 2009, Compston 1980, Carlsson 1990, Giraud 2001, Larsen 2004, Avidan 2014, 35-39].

La presencia de los alelos DRB1*03:01 y DQB1*02:01 de forma simultánea se observó en seis de los 16 pacientes (37.5%) en nuestra serie. DRB1*03:01 representó 6 de los 32 alelos totales; DQB1*05:01 representó 8 de los 32 alelos totales, y DQB1*02:01 en 6 de los 32 alelos y tanto DQB1*05:03 como DQB1*03:01 representaron 4 de los 32 alelos totales.

Conjuntamente, DRB1*03:01, DQB1*05:01 y DQB1*02:01 sumaron 20 de los 32 alelos totales de la serie (68.75%). Las variantes alélicas menos comunes halladas en nuestros pacientes se recogen en las tablas (tablas 4 y 5).

Los alelos más representativos en nuestra cohorte FAMG fueron: HLA-DRB1*03:01, *01:01, *01:02, *13:01, *14:54 y HLA-DQB1*05:01, *02:01, *05:03, *03:01,*06:03 respectivamente. El tipo de herencia genética sugirió un patrón autosómico dominante (AD) en 4 familias y autosómico recesivo (AR) en el resto de pedigrís.

5.2.2. HLA-DRB1 y HLA-DQB1 como factores de riesgo para FAMG

En el estudio, no se pudieron reproducir los resultados previamente publicados que definían a DRB1*03:01 y/o DQB1*02:01 como factores de riesgo para FAMG, a pesar de que estos alelos fueron los más frecuentes en nuestro grupo de casos familiares de miastenia gravis autoinmune, seguidos de DQB1*05:01 y DRB1*01:01. Por el contrario, HLA-DQB1*05:03 mostró diferencias estadísticamente significativas entre los casos de FAMG y el grupo control (OR 13.57; 95% CI 1.46-126.40; $p=0.022$; $p\text{-aj}=0.44$) aunque estas diferencias no se mantuvieron después de aplicar la corrección por test múltiples (MTC) (tablas 4 y 5). La frecuencia de este alelo en diversas poblaciones españolas es 0.0255 en 1.590 alelos analizados (IC95% [0.0184-0.0342]; datos obtenidos de <http://www.allelefrequencies.net>). Basándose en esta frecuencia en población española como grupo control, el efecto del alelo DQB1*05:03 sobre el grupo de FAMG para el riesgo de enfermedad sería OR=9.94 (95% CI [3.18 – 31.06]). Además, el alelo DRB1*14:54 mostró una tendencia para la significación estadística en FAMG en nuestra cohorte (tabla 4).

El alelo DQB1*05:03, como parte del haplotipo DRB1*14 se había descrito anteriormente asociado a pacientes con MG de debut temprano (EOMG), hiperplasia tímica y títulos elevados de anticuerpos anti-AChR en población china de Singapur [Chan 1993] y con casos atípicos de EOMG en mujeres del Sureste de Tejas, como parte del haplotipo DQA1*01:04/DQB1*05:03 [Deitiker 2011]. Adicionalmente, Hirunagi y col. publicaron recientemente los datos de una familia japonesa con dos hermanos con MG de debut muy tardío (VLOMG), portadores del alelo DRB1*14:54, aunque no se reportaron datos de DQB1 [Hirunagi 2016].

En contraposición, el mismo haplotipo DR14/DQ5 se ha asociado tradicionalmente a la miastenia MuSK positiva, como en el ejemplo de la familia danesa reportada en 2006 [Niks 2006].

En nuestras familias, los individuos portadores de los alelos DRB1*14 o DQB1*05:03 eran todos anti-AChR positivos y sus edades y clases MGFA al debut no presentaban similitudes.

Los casos de miastenia familiar con anticuerpos anti-MuSK positivos son excepcionales en la literatura [Corda 2011, Lavrnjic 2008].

5.2.3. HLA-DRB1 y DQB1 como factores modificantes de fenotipo en FAMG

En relación al género de los pacientes, los alelos DRB1*03:01 y DQB1*02:01 eran mucho más prevalentes en mujeres con FAMG (5 de 7, 71.4% para DR3 y 6 de 6, 100% para DQ2). La mayoría de los casos FAMG con un debut ocular o MGFA-IIa presentaban alguno de los alelos DRB1*03:01 o DQB1*02:01, o bien una combinación de ambos.

Un 50% de los casos FAMG portadores de DRB1*03:01 y DQB1*02:01 tenían hiperplasia tímica asociada a la MG, 4 de los 6 pacientes (66.7%) tenían anticuerpos positivos anti-AChR, que también estaban presentes en otros dos casos portadores de DRB1*03:01 o DQB1*02:01.

No se encontraron diferencias en la distribución de estos dos alelos ni de DQB1*05:01 cuando clasificamos a los pacientes según su edad de inicio (EO, LO, VLOMG) ni el patrón de herencia sospechado (AD, AR). Los resultados preliminares de este estudio sugirieron que existen diversos factores genéticos implicados en la aparición y el desarrollo de los síntomas de FAMG, como sucede en otras enfermedades neurológicas [Taylor 2016, Van Rheenen 2016, Chae 2015, Bachinski 2003].

Investigar los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1 de los familiares de primer grado no afectados de MG podría contribuir a una mejor comprensión de la probable influencia de estos loci en el fenotipo de FAMG en el futuro.

5.3. Estudio de alelos y haplotipos HLA en una población española de miastenia gravis autoinmune esporádica

En este estudio, se reportan los resultados de un estudio novedoso sobre la distribución y las implicaciones de los alelos HLA de clase I y clase II en una población española de miastenia gravis autoinmune y esporádica, utilizando un genotipado NGS de alta resolución. A nuestro entender, este trabajo representaría la primera descripción de un estudio de tipado HLA de alta resolución en una población de MG española usando tecnología NGS.

Los principales resultados se resumen a continuación. Algunos aspectos concretos son novedosos: (1) HLA-DQB1*03:01 parece actuar como factor de riesgo para el debut temprano (EOMG) en mujeres con hiperplasia tímica y anticuerpos anti-AChR positivos; (2) HLA-A*24:02 tendría un rol como factor protector para MG en mujeres, mientras que (3) B*07:02, C*07:02 y DQB1*02:02 actuarían como factores modificadores de fenotipo, predisponiendo a sus portadores a un inicio más tardío de la enfermedad. En ese sentido, también observamos que DQB1*02:02 y DRB1*07:01 fueron mucho más comunes en aquellos casos de MG con un inicio muy tardío (> 65 años).

Las siguientes asociaciones reportadas previamente pudieron ser replicadas en nuestra cohorte: (1) los alelos HLA-A*01:01, B*08:01, DRB1*03:01, DRB1*14:54, DQB1*02:01, DQB1*05:02 y DQB1*05:03 actuaron como factores de riesgo para desarrollar miastenia gravis en nuestra región, (2) los mismos alelos A*01:01, B*08:01, DRB1*03:01, DQB1*02:01, así como C*07:01, determinaron un mayor riesgo de desarrollar miastenia gravis en mujeres, y también se identificaron como factores de riesgo para un inicio temprano de los síntomas (EOMG), junto a DQB1*05:02. (3) En esta última comparación (early vs late and very late onset SAMG), el haplotipo ancestral HLA B*8.1 haplotype o AH 8.1 (A1-B8-C7-DR3-DQ2) se detectó de forma significativamente más habitual en el grupo EOMG. (4) En el mismo orden de ideas, las mujeres con una MG de debut temprano (EOMG), con anticuerpos anti-AChR positivos e hiperplasia tímica, mostraron una prevalencia mayor de los alelos B*08:01, C*07:01 y DQB1*03:01.

En los pacientes con timoma, no se pudieron identificar factores de riesgo, protección o modificantes de fenotipo entre los alelos y haplotipos HLA, que los distinguieran claramente del resto de pacientes con MG.

Como se mencionó anteriormente, una parte importante de los resultados obtenidos respalda y replica los de estudios previos en diferentes poblaciones de miastenia de origen caucásico procedentes de países europeos y americanos.

En referencia al riesgo de desarrollar MG, varios autores reportaron una mayor frecuencia de los antígenos HLA-A*01, HLA-B*08 y/o DRB1*03/DQB1*02:01 en los casos de miastenia respecto a los controles, especialmente en mujeres con MG de debut temprano e hiperplasia tímica [Fritze 1973, 1974, Feltkamp 1974, Naeim 1978, Pirskanen 1976, Vieira 1993, Hjelmström 1995]. Sabemos que los alelos DRB1*03 están en desequilibrio de ligamiento (LD) con DQA1*05:01 y DQB1*02:01 [Vieira 1993]. De forma similar, el AH 8.1 [A1-B8-(C7)-DR3] se ha asociado, en diversas cohortes de origen caucásico, con la miastenia de debut temprano (EOMG) [Maniaol 2012], particularmente en mujeres con hiperplasia tímica y anticuerpos anti-AChR [Compston 1980, Spurkland 1990]. Dos estudios GWAS independientes señalaron al alelo HLA-B*08 como el principal factor de riesgo para este fenotipo [Gregersen 2012, Maniaol 2012].

Nuestro estudio ha identificado a HLA-B*07:02, conjuntamente con C*07:02 y DQB1*02:02, como factores modificantes de fenotipo, que predisponían a sus portadores a un debut más tardío de la enfermedad. HLA-B*07:02 puede estar en desequilibrio de ligamiento (LD) con C*07:02, pero también con DRB1*15:01, DQB1*05:01, DQB1*01:01, DRB1*07:01 y DQB1*02:01g (incluye DQB1*02:02) en poblaciones europeas [Maiers 2007].

HLA-B*07 ya se había postulado con una débil asociación con LOMG en una cohorte noruega, donde se reconoció a DRB1*15:01 como el principal factor de riesgo para las formas debut tardío de la enfermedad [Maniaol 2012]. Otros autores han reportado el alelo B*07 en hombres con LOMG y otras enfermedades autoinmunes con títulos bajos de anticuerpos anti-AchR [Compston 1980].

De acuerdo con los hallazgos histopatológicos del timo, clasificamos a los pacientes en dos subgrupos diferentes (MG+timoma y MG sin timoma) y no hallamos diferencias en la distribución, ni las frecuencias de los alelos HLA entre los dos subgrupos. A pesar de que algunos autores habían referido la asociación de algunas variantes HLA-A, DQA1, DRB1 y/o DQB1 en pacientes con MG y timoma [Fritze 1974, Feltkamp 1974, Vieira 1993, Carlsson 1990, Machens 1999, García-Ramos 2003, Saruhan-Direskeneli 2006, Yang 2012].

Nuestros resultados son consistentes con los datos procedentes de publicaciones previas en las principales cohortes de origen caucásico y asiáticas (China), en las cuales no

se pudo relacionar ningún alelo o haplotipo característico a este grupo de pacientes [Compston 1980, Maniaol 2012, Zhu 2012, Giraud 2001, Xie 2011].

La heterogeneidad observada en los distintos estudios HLA en casos de miastenia con timoma, se podría explicar por un sesgo de selección de los pacientes con miastenia y del estadiaje histopatológico del tumor [Vandiedonck 2009] o quizás por los criterios de selección usados para el grupo control con el que comparamos a los pacientes con timoma (individuos sanos, miastenia, hiperplasia tímica, atrofia o timo normal, miastenia sin timoma y con cualquiera de los supuestos anteriores o pacientes con MG no timectomizados). Además, sólo algunos de estos estudios incluyeron todos los loci codificantes de HLA en su análisis.

En nuestra población, DQB1*05:02, *05:03 y *06:03 mostraron una tendencia a la significación estadística como posibles determinantes de riesgo para MG en el subgrupo de mujeres. DQB1*05:02 y DQB1*05:03 también se actuaron como factores de riesgo para MG en el total de nuestra cohorte. Se ha descrito que DQB1*05:02 se encuentra en desequilibrio de ligamento con A*01:01, C*07:01, B*08:01, DRB1*16:01 y DRB1*14 en población europea [Maiers 2007, Testi 2012]. DQB1*05:02 también ha sido identificado junto a HLA-DQA1*01:01 en mujeres con EOMG en una población de Irán del Sur [Yousefipour, 2009] y en mujeres turcas con EOMG (junto a DQA1*01:03) [Saruhan-Direskeneli 2006].

En oposición a nuestros resultados, en pacientes italianos, se ha propuesto una asociación potente entre los casos con debut tardío (LOMG) y títulos bajos de anti-AChR al HLA DQB1*05:02-DRB1*16 [Testi 2012] y existen evidencias claras en la literatura de la elevada prevalencia del grupo HLA-DQB1*05 (incluyendo los alelos *05:01, 05:02 and 05:03) en pacientes MuSK-positivos de diversa procedencia étnica [Niks 2006, Bartoccioni 2009, Alahgholi-Hajibehzad 2013, Ehsan 2015, Kanai 2016, Hong 2018].

Volviendo a los resultados novedosos de nuestro estudio, hemos encontrado una mayor prevalencia de los alelos B*08:01, C*07:01 y DQB1*03:01 en mujeres EOMG, con anti-AChR positivos e hiperplasia tímica. Después de una extensa revisión bibliográfica, no pude hallar ningún trabajo que describa la asociación de DQB1*03:01 y miastenia gravis en población española ni del norte de Europa, aunque se conoce que este alelo es más frecuente en formas generalizadas de MG en población asiática con EOMG y anti-AChR positivos [Yang 2012, Horiki 1994]. Autores turcos han publicado sus resultados sobre la expresión de este antígeno en pacientes con miastenia y timoma [Saruhan 2006].

En las formas de MG de debut muy tardío (VLOMG), los alelos DRB1*07:01 y DQB1*02:02 (en LD como señalamos anteriormente) fueron mucho más frecuentes que en los casos EOMG en nuestra serie. En nuestra opinión, el rol de HLA-DRB1*07:01 y DQB1*02:02 como factores modificantes en pacientes con fenotipo VLOMG merece especial énfasis. Aunque no se deben considerar como determinantes causales para la aparición de la MG, nuestra hipótesis se basa en el hecho de que pueden actuar modificando de alguna forma el inicio de los síntomas, retrasándolo hasta edades muy avanzadas.

A pesar de que DRB1*07 se describió en 2011 como el alelo más común en pacientes con LOMG (>40 años) en una población de China [Xie 2011], tampoco pudimos encontrar otros estudios en otras poblaciones donde se asociaran estos alelos a LOMG.

Finalmente, en nuestro grupo de mujeres, el alelo HLA-A*24:02 puede jugar un papel protector frente a desarrollo de síntomas de MG. En realidad, los factores protectores HLA en MG son poco conocidos y se encuentran pocas referencias en la literatura acerca de ellos. No pudimos encontrar ningún trabajo que describiera a HLA-A*24:02 como factor protector para MG en población caucásica. De hecho, la asociación de HLA-A*24, DQB1*02 y DQB1*03:01 con el fenotipo MG y timoma, descrita previamente en este apartado, iría totalmente en dirección opuesta [Machens 1999, Saruhan-Direskeneli 2006, Yang 2012].

Nuestro estudio incluye un número de muestras de individuos con SAMG muy significativo, siendo así sus resultados suficientemente representativos de una muestra de población española con miastenia gravis autoinmune esporádica. No obstante, en algunos subgrupos, contamos con un número de individuos muy pequeño, de manera que sería necesario reproducir estos resultados en cohortes más extensas en pacientes con los fenotipos correspondientes. La tabla 16 contiene un resumen de los principales estudios realizados previamente en MG y HLA en todo el mundo (tabla 16).

5.4. Estudio del gen ENOX1 como potencial factor de riesgo para las formas familiares de miastenia gravis en una cohorte española

En este estudio, se describen los resultados de un estudio sobre el papel de la variante ENOX1 c.*35A>G como un posible factor de susceptibilidad para el riesgo en FAMG y un factor modificante de fenotipo en una población española de MG. La prevalencia de FAMG en nuestra cohorte fue similar a la de otras series previamente publicadas [Salvado 2016].

5.4.1. ENOX1 c.*35A>G como factor modificante de fenotipo en FAMG

En nuestro estudio, no identificamos la variante c.*35A>G localizada en la región 3'UTR de ENOX1, reportada en una familia consanguínea de origen italo-americano con patrón autosómico recesivo [Landouré 2012], en ninguna de las cohortes de pacientes estudiados (FAMG y SAMG). Esta variante se consideró patogénica, puesto que los familiares portadores del cambio c.*35A>G presentaban una reducción considerable de la actividad de ENOX1 in vivo (mRNA). ENOX1 es una proteína que pertenece a la familia de las NAD(P)H oxidasas [Jiang 2008, Morré 2003].

Aunque el gen ENOX1 podría ser un posible candidato entre los factores genéticos de predisposición para FAMG, en nuestra cohorte española, la variante c.*35A>G no parece ser ni un cambio prevalente que motive la aparición/causa de la enfermedad. El rol de la variante c.*35A>G de ENOX1 como gen candidato para miastenia gravis autoinmune no se pudo replicar en nuestra población.

Una limitación clara de este estudio, así como el estudio discutido anteriormente (“Estudio del rol de los alelos HLA-DRB1 y DQB1 en las formas familiares de miastenia gravis autoinmune en una cohorte española”) y como sucede también en los trabajos previamente reportados, es el tamaño muestral tan reducido del grupo FAMG, debido a la baja prevalencia (3,46%) de estos casos. Para compensar esta debilidad, es necesario diseñar estudios multicéntricos que incluyan un número de pacientes con FAMG suficiente para identificar mejor los genes candidatos más probables, simulando la estrategia empleada en otras enfermedades neuromusculares raras [Taylor 2016, Van Rheenen 2016, Chae 2015, Bachinski 2003].

5.4.2. Nuevas variantes (SNPs) en la región 3'UTR de ENOX1

Ampliando el estudio de la región 3'UTR del gen ENOX1, se identificaron tres variantes de ENOX1 c.1900 C>T(rs 703207), c.*90A>C (rs703206) y c.*95A>G (rs1044753) que presentaron frecuencias más elevadas en nuestra población de MG familiar y/o esporádica que la reportada en población ibérica (IBS) del Proyecto 1000 Genomes.

Tras una revisión exhaustiva, no pudimos encontrar referencias en la literatura a ninguna de estas variantes del gen ENOX1 en posible relación con MG familiar o esporádica. Para confirmar los resultados obtenidos en este trabajo, se continuó estudiando las variantes identificadas mediante técnicas de genotipado KASPar.

Según nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de un estudio mutacional de la región 3'UTR de ENOX1, incluyendo la variante c.*35A>G, realizado en una población española que incluye FAMG y SAMG, y la segunda en todo el mundo tras la población estudiada por Landouré y col. [Landouré 2012].

El rol de gen ENOX1 como factor genético de susceptibilidad no se limita a la miastenia gravis. Ha sido estudiado en otras enfermedades autoinmunes y no autoinmunes como la artritis reumatoide (rs9594987), la nefropatía asociada a APOL1 (rs9533534), la esquizofrenia y la dependencia a la nicotina (rs112531467) [Maldonado-Montoro 2016, Divers 2014, Chen 2016].

5.4.3. Estudio de asociación genética de variantes del gen ENOX1 en formas familiares y esporádicas de MG mediante KASPar

Ninguna de las nuevas variantes identificadas por secuenciación Sanger (rs 703207, rs703206 y rs1044753), ni la variante rs 7338624, se pudieron confirmar como factores de riesgo para la enfermedad en nuestro estudio caso-control usando genotipado KASPar.

Los resultados de los análisis de secuenciación y de genotipado KASPar son claramente diferentes, por lo que es probable que una de las técnicas hayan generado un sesgo en el análisis. Se obtuvieron los genotipos por KASPar de todos los casos y controles analizados, pero no fue posible obtener todas las secuencias de las regiones 3'UTR del gen ENOX en todos los pacientes MG analizados. A priori las diferencias en los resultados podrían ser debido a un problema con el análisis de secuenciación.

Una posible explicación es que la técnica de genotipado KASPar permite analizar un punto concreto de un gen y la localización de los *primers* alelo-específico difieren de la que ocuparían los *primers* utilizados en la secuenciación por el método Sanger. Esta diferencia en la localización de los *primers* utilizados en la secuenciación del 3'UTR del gen ENOX1 explicaría que muy probablemente se hubiera producido un sesgo involuntario en la selección de los primers durante el proceso de diseño de los experimentos de secuenciación Sanger. Es posible que los *primers* de secuenciación estuvieran localizados en una región polimórfica del gen ENOX1, esto habría conducido a que en unas muestras hubiese funcionado bien la amplificación PCR y la secuenciación y en otras muestras con polimorfismos (en la región de los primers de secuenciación) no hubiese funcionado. Esta alteración de la amplificación génica en algunas de las muestras analizadas, generó un sesgo que pudo dar lugar a estimar erróneamente las frecuencias de las variantes detectadas en los experimentos de secuenciación.

Este sesgo en los análisis mutacionales de ENOX1 hace que tengan que tomar con cautela las frecuencias obtenidas por secuenciación de las variantes identificadas.

En cambio, las frecuencias obtenidas por métodos KASPar no parecen tener errores debido a la metodología utilizada. Prueba de ello es que no hay diferencias entre los casos y controles analizados. Por tanto se le da credibilidad a los genotipos obtenidos por KASPar.

Los estudios de asociación genética (con genotipado KASPar) o del gen ENOX1 indican que este gen parece actuar como un factor modificante de fenotipo, en relación a la edad de debut de la MG y que en nuestra cohorte, según un modelo genético recesivo. Las mujeres con MG de debut temprano homocigotas para la variante rs1094753 podían iniciar los síntomas de la enfermedad de forma más tardía que el resto de las pacientes EOMG con el genotipo heterocigoto o *wild type*. El análisis por haplotipos determinó que los pacientes portadores del haplotipo CGGC presentaban una diferencia en la edad de debut de la MG de unos 22 años respecto al resto del global de pacientes y que los pacientes con el haplotipo CGAC tendrían un riesgo aumentado de tener un timoma asociado a la MG.

Los trabajos previamente publicados, mayoritariamente GWAS, no incluyen o identifican al gen ENOX1 dentro de sus genes candidatos. Sin embargo, otros genes no-HLA y sus respectivas variantes han sido reportados en MG como variables de riesgo, susceptibilidad o que modifican el fenotipo de los pacientes con MG, incluidos los que codifican la proteína tirosina fosfatasa tipo 22 (PTPN22), proteína de interacción TNFAIP3 (TNIP 1) y la proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (CTLA4), catepsina (CTSL2),

Galectina-1 (LGALS1), TNFRSF11A, FOXP3, CHRNA1 y CHRND [Lefvert 2008, Greve 2009, Gregersen 2012, Zagoriti 2013, Renton 2015, Seldin 2016, Heckmann 19963, Djabiri 1997, Giraud 2004, Giraud 2008].

Los resultado obtenidos son novedosos y por tanto, hallazgos. Para poder confirmar que ENOX1 es un gen modificador del fenotipo de MG, estos resultados deberían ser reproducidos y confirmados en otras series de población española, de otras poblaciones caucásicas y de otros grupos étnicos.

5.5. Discusión conjunta

El presente trabajo de investigación se inicia planteándose que la hipótesis de que diversos factores genéticos pueden influir en la aparición de la MG autoinmune, así como en su fenotipo clínico, serológico e histopatológico, tanto en las formas esporádicas como familiares de la enfermedad.

En base a esta hipótesis y a los objetivos planteados, se estudió una muestra amplia de casos de MG autoinmune con datos de seguimiento evolutivo recogidos en nuestra unidad especializada en el HUVH durante casi 15 años, para poder definirlos desde el punto de vista fenotípico (clínico, serológico, histopatológico) y analizar el rol de los principales factores genéticos identificados previamente como posible factores de riesgo, susceptibilidad, protección o modificantes de fenotipo en nuestra población española de pacientes SAMG y FAMG. Para ello, realizamos en total 4 proyectos de investigación, los resultados de los cuáles, se resumen de forma más sintética a continuación.

Nuestros resultados demuestran que las formas familiares de miastenia gravis autoinmune (FAMG) son fenotípicamente indistinguibles de las formas esporádicas (SAMG); que presentan una enorme heterogeneidad intra e interfamiliar en su fenotipo no solamente clínico (forma y edad de presentación, clasificación MGFA debut, gravedad) sino también en cuanto a su perfil inmunológico e histopatológico y que representan un 3,46% de los casos en nuestra población. Todas estas características reproducen los resultados de estudios previos publicados en FAMG en otras poblaciones.

Para intentar comprender mejor el porqué de esta variabilidad intra e interfamiliar, nos planteamos investigar el papel de los alelos HLA-DRB1 y DQB1 en nuestra población de FAMG. En nuestra serie, los alelos DRB1*03:01 y/o DQB1*02:01 fueron los más frecuentes tanto de forma aislada como combinada. Como en otras series previamente reportadas, estos alelos eran más comunes en mujeres con FAMG, debut ocular o MGFA-IIa e hiperplasia tímica. Aunque estas variantes fueron frecuentes en los pacientes, no pudimos demostrar su asociación directa a FAMG como factores de riesgo para la enfermedad. Los resultados de asociación estadísticos de HLA-DQB1*05:03 y DRB1*14:54 como posibles factor de riesgo para FAMG en nuestra población son nominalmente inferiores a un error de tipo alfa igual a 0.05. Pero estos resultados no consiguieron superar la significación estadística después de la corrección por múltiple tests (MTc). Por tanto no podemos demostrar la asociación de los alelos DRB1*03:01, DQB1*02:01, DQB1*05:03 y/o DRB1*14:54 como factores de riesgo para la enfermedad FAMG.

En el mismo sentido, pudimos comprobar que en nuestra población de FAMG, así como en una pequeña muestra de SAMG, el SNP c.35*A>G en el gen ENOX1, descrito por Landouré como patogénico en una familia italo-americana consanguínea, no se encontraba en ninguno de nuestros casos estudiados. Asimismo, las variantes identificadas inicialmente en la región 3'UTR de ENOX1 por secuenciación Sanger (rs 703207, rs703206 y rs1044753) y asociados potencialmente como factores de riesgo, no se confirmaron como factores de riesgo para la enfermedad en nuestro estudio caso-control genotipando mediante tecnología KASPar. Este hecho es probablemente debido a la presencia de un sesgo involuntario en la selección de los *primers* de secuenciación Sanger, que habrían conducido a una alteración de la amplificación génica en algunas de las muestras analizadas, provocando que las frecuencias de nuestros casos fueran diferentes de las frecuencias poblaciones descritas en las bases de datos.

En cambio, el estudio de marcadores simples mediante genotipado KASPar mostró otros resultados prometedores, ya que señaló algunas variantes en el análisis de marcadores simples (rs1044753) como posibles factores modificadores de fenotipo en cuanto a la edad de inicio en mujeres con MG de debut temprano (EOMG) y en el análisis por haplotipos, identificó al haplotipo CGGC como factor modificante de la edad de inicio de MG y al haplotipo CGAC como factor de riesgo para la aparición de timoma en el grupo de SAMG y FAMG de nuestra población.

En el último de nuestros estudios evaluamos la prevalencia, la distribución y el papel de los alelos y haplotipos HLA de clase I y clase II (de alta resolución) en nuestra cohorte de pacientes con miastenia gravis autoinmune esporádica (SAMG). En este estudio pudimos identificar nuevas asociaciones de los alelos HLA con la enfermedad: (1) entre el alelo DQB1*03:01 y el riesgo de EOMG en mujeres con anti-RACh positivos e hiperplasia tímica del timo (reportado como factor de riesgo para MG generalizada en asiáticos); (2) el efecto protector contra MG del alelo HLA-A*24:02 en mujeres y (3) el papel protector de DRB1*07:01 y DQB1*02:02 en EOMG, siendo más comunes entre los casos con VLOMG, en los cuales, según nuestra hipótesis, podrían tener un papel como factores modificantes de fenotipo.

Las nuevas terapias biológicas, algunas de ellas actualmente en fase de ensayo clínico, consistirán en medicamentos más efectivos que los actuales pero con un previsible impacto económico mayor en el gasto sanitario. Nuestro grupo de investigación trabaja activamente en este sentido con el objetivo de profundizar en el conocimiento detallado del

componente genético individual, para optimizar la respuesta al tratamiento, especialmente en pacientes refractarios o con problemas de tolerabilidad a los inmunomoduladores.

Las variantes identificadas en el gen ENOX1 en este trabajo podrían estar involucradas de alguna forma en la etiopatogenia de MG. Aunque el papel funcional de ENOX1 en MG no está muy claro en estos momentos, los estudios realizados por el grupo de Landouré y col. consideraron este gen como posiblemente patogénico por la reducción considerable de la actividad de ENOX1 in vivo (mRNA) en los individuos MG portadores de la variante c*35A>G. ENOX1 tiene un papel asociado con la regulación del sistema inmune inhibiendo la proliferación de linfocitos T [Aswad 2005]. Se ha asociado 2 SNPs en ENOX1 con artritis reumatoide [López Herraes 2013] y la respuesta a tocilizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de interleukina 6 (IL-6) [Wang 2013]. Por tanto, ENOX1 puede participar en las vías de señalización relacionadas con IL-6 y CD38. Esta asociación de MG con diferentes genes relacionados con el sistema inmune, nos abre una nueva línea de investigación para plantearnos como podría el gen ENOX1 ejercer sinergias con otros posibles genes principales (ej. HLA), o la combinación de varios polimorfismos en genes candidatos de predisposición o susceptibilidad, para modular la expresión fenotípica del sistema inmune en MG. Sería interesante realizar estudios de funcionalidad de las variantes del gen ENOX1 potencialmente patogénicas en un modelo experimental de MG (EAMG) en relación a otros SNPs candidatos identificados mediante estudios de secuenciación masiva o NGS.

Tabla 16. Resumen de los principales estudios publicados en MG autoinmune y alelos o haplotipos HLA de riesgo

ALELO HLA	FENOTIPO	ORIGEN	AUTOR
A*01	MG raza negra	Brasil	Dias-Tosta 1990
A*02	MG+timoma	Europa (Francia)	Vandiedonck, 2009
A*03	LOMG+timoma	Europa	Feltkamp, 1974
	LOMG+timoma	Europa	Fritze, 1974
	LOMG	América (EUA)	Newton-Davies, 1987
A*24	Timo normal/atrófico o tímopoma	Europa (Alemania)	Machens, 1999
	Timoma	Europa (Alemania)	Machens, 1999
		Turquía	Saruhan-Direskeneli, 2006
B*08	EOMG mujeres+hiperplasia tímica	Europa (Finlandia)	Pirskanen, 1976
	EOMG mujeres+hiperplasia tímica	Brasil	Dias-Tosta 1990
	EOMG/EOMG mujeres	Europa y América (EUA)	Gregersen, 2012
	EOMG mujeres	Europa (Países Bajos)	Feltkamp, 1974
	EOMG mujeres	Arabia Saudí	Hajeer, 2009
	MG raza negra	Brasil	Dias-Tosta 1990
DRB1*01	MG/EOMG	Europa (Portugal)	Santos, 2017
	LOMG	Europa (Portugal)	Santos, 2017
DRB1*02	MG mujeres+timoma	Europa (Suecia)	Carlsson, 1990
DRB1*03	MG sin timoma + hiperplasia tímica	Europa (Suecia)	Carlsson, 1990
	EOMG mujeres + hiperplasia tímica	Europa (Francia)	Vieira, 1993
	MG+ hiperplasia tímica	Europa (Francia)	Giraud, 2001
	MG no timectomizados ATA negativos	Europa (Francia)	Giraud, 2001
	EOMG hombres	Tunisia	Fekih-Missa, 2013
	MG/EOMG	Europa (Portugal)	Santos, 2017

ALELO HLA	FENOTIPO	ORIGEN	AUTOR
DRB1*04	LOMG mujeres	Tunisia	Fekih-Missa, 2013
DRB1*04:04	MG juvenil pre-puberal (<12 años)	Europa (Noruega)	Popperud, 2017
DRB1*07	MG no timectomizada ATA positiva	Europa (Francia)	Giraud, 2001
	LOMG	China	Xie Y., 2011
DRB1*08:03	MG+alteracion tiroidea autoinmune asociada	Japón	Suzuki, 2001
DRB1*09:01	EOMG ocular seronegativa	China (Han)	Feng H., 2012
DRB1*09	EOMG ocular seronegativa	China (Han)	Xie Y., 2011
	MG ocular juvenil (infancia)	Japón	Shinomiya, 2004
DRB1*10	MG+timoma	Europa (Portugal)	Santos, 2017
DRB1*11	MG+timoma	Méjico	García-Ramos, 2003
DRB1*14	MG-MuSK	Turquia	Alahgholi-Hajbehzad, 2013
		Japón	Kanai, 2016
		Japón	Hong, 2018
DRB1*16	MG-MuSK	Turquia	Alahgholi-Hajbehzad, 2013
		Japón	Hong, 2018
DQA1*01:01	ATA negativo	Turquia	Saruhan-Direskeneli, 2006
DQA1*01:02	ATA negativo	Turquia	Saruhan-Direskeneli, 2006
	EOMG	China (Norte)	Yang 2012
DQA1*02	ATA positivo	Turquia	Saruhan-Direskeneli, 2006
DQA1*02:01	MG AChR positiva	China (Norte)	Yang, 2012
DQA1*03	MG AChR positiva	Turquia	Saruhan-Direskeneli, 2006
DQA1*04:01	MG+timoma	China (Norte)	Yang, 2012
DQB1*02	EOMG mujeres	Turquia	Saruhan-Direskeneli, 2006
DQB1*02:01	EOMG (<30 años)	Europa (Suecia)	Hjelmström, 1999
	EOMG hombres	Tunisia	Fekih-Missa, 2013
	MG+timoma	Turquia	Saruhan-Direskeneli, 2006

ALELO HLA	FENOTIPO	ORIGEN	AUTOR
DQw3	MG juvenil (≤15 años)	Japón	Matsuki, 1990
DQB1*03	EOMG mujeres	Japón	Horiki, 1994
DQB1*03:01	MG generalizada	China	Yang, 2012
	MG+timoma	Turquía	Saruhan-Direskeneli, 2006
DQB1*03:02	MG AChR positiva	Turquía	Saruhan-Direskeneli, 2006
	LOMG mujeres	Tunisia	Fekih-Missa, 2013
DQB1*04:02	LOMG	Japón	Suzuki, 2001
DQB1*05	MG-MuSK	Europa (Italia)	Bartocconi, 2009
		Turquía	Alahgholi-Hajbehzad, 2013
		Japón	Kanai, 2016
		Japón	Hong, 2018
DQB1*05:01	MG ocular	China (Norte)	Yang, 2012
	MG+timoma	Europa (Italia)	Massa, 2019
DQB1*05:02	EOMG hombres	Turquía	Saruhan-Direskeneli, 2006
	LOMG	Europa (Italia)	Testi, 2012
	LOMG+NO timoma+AChR positiva	Europa (Italia)	Massa, 2019
	EOMG	Tejas (Sur este, EUA)	Deitker, 2011
DQB1*05:03	EOMG	Tejas (Sur este, EUA)	Deitker, 2011
DQB1*06:04	MG+timoma	China (Norte)	Yang, 2012
	EOMG mujeres+timoma	Europa	Vieira, 1993
	EOMG	Tejas (Sur este, EUA)	Deitker, 2011
	EOMG+ AChR positiva títulos altos	Japón	Suzuki, 2001
DPB1*02:01	MG	Japón	Horiki, 1994

HAPLOTIPO HLA	FENOTIPO	ORIGEN	AUTOR
A*01-B*08-DRB1*03	EOMG+hiperplasia tímica	Europa	Compston, 1980
A*01-B*08-C*07-DRB1*03	EOMG	Europa (Noruega)	Maniaol, 2012
A*01/B*08/DRB1*03/DQB1*05	EOMG mujeres+hiperplasia tímica	Europa (Alemania)	Machens, 1999
A*01-B*08-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02:01	EOMG+hiperplasia tímica	Europa (Noruega)	Spurkland, 1991
A*0207/B*4601/DRB1*0403/DRB1*0901/DRB1*1602	MG juvenil ocular	China (Han Sur)	Feng, 2015
A*03-B*07-DRB1*02	LOMG	Europa	Compston, 1980
B*08/DRB1*03	MG AChR positiva títulos altos +no timoma	América (EUA)	Naiem, 1978
B*08/DRB1*03/DQB1*02/DQA1*05	EOMG mujeres+hiperplasia tímica	Europa (Francia)	Vieira 1993
B*08:01/C*07:01/rs113519545 HLA clase I	EOMG	Turquia	Saruhan, 2016
Bw44/BFF/CYA3B1-DRw13-DQw1	MG juvenil	Japón	Matsuki, 1990
Bw46/DR9	MG juvenil ocular	China	Chen 1993
Cw1 B46/DRB1*09:01/DQB1*0303/DQA1*03	MG/EOMG ocular AChR positiva títulos bajos/timo normal	Singapur (pobl. china)	Chan 1993
DR3-DR16	MG+hiperplasia tímica	Europa (Francia)	Giraud, 2001
DRB1*03/DQB1*02	EOMG hombres	Tunisia	Fekih-Missa, 2013
DRB1*04/DQB1*03:02	LOMG mujeres		
DRB1*04/DQA1*03:01/DQB1*03:02	MG AChR positiva	Iran	Ehsan, 2015
DRB1*09:01/13:01	FAMG	China	Bitao, 2010
DR9/DR13	MG infancia (≤3 años)	Japón	Matsuki, 1990
DRB1*0901/DQB1*0303/DQA1*0301	MG ocular debut infancia	Japón	Shinomiya, 2004
DRB1*1202/DRB3*0301/DQB1*0301/DQA1*0601	LOMG ocular+timoma+ AChR positiva títulos medios-altos	Singapur (chinos)	Chan 1993
DRB1*1302/DQB1*0604/DQA1*0102	MG ocular debut infancia	Japón	Shinomiya, 2004

HAPLOTIPO HLA	FENOTIPO	ORIGEN	AUTOR
DRB1*14/DQB1*05	MG-MuSK	Europa (Países Bajos)	Niks, 2006
DRB1*14/DQB1*05/DQA1*0104	MG-MuSK	Japón	Hong, 2018
DRB1*14/DRB3*0202/DQB1*0503/DQA1*0101	EOMG generalizada+hiperplasia tímica+ AChR positiva títulos altos	Iran	Ehsan, 2015
DRB1*15/DQB1*05:02	LOMG AChR positiva sin tímoma	Singapur (pobl. china)	Chan 1993
DRB1*15:01-B*07	LOMG	Europa (Italia)	Testi, 2012
DRB1*16/DQB1*05:02	LOMG+no tímoma+ AChR positiva	Europa (Noruega)	Maniaol A., 2012
DRB1*16/DQA1*01:02/DQB1*05	MG-MuSK	Europa (Italia)	Massa, 2019
DRB1*16/DQB1*05	MG-MuSK	Iran	Ehsan, 2015
DQB1*02:01/DQA1*05:01	MG	Japón	Hong, 2018
DQB1*0301/DQA1*0501	MG	Europa (Suecia)	Hjelmström, 1995
DQB1*03:02/DQA1*03:02 (DQ9)	MG generalizada	China (Norte)	Yang 2012
DQB1*0502/ DQA1*01:01/2	MG juvenil (infancia) ocular	Japón	Horiki, 1994
DQB1*05:02/ DQB1 intrónica (rs68081734)	EOMG	China (Han)	Zhu, 2012
DQB1*0503/ DQA1*0104	MG-MuSK	Iran (Sur)	Yousefipour, 2009
HLA clase I rs11256513	LOMG	Turquía	Saruhan-Diriskeneli, 2016
	MG-MuSK + seronegativas	Tejas (Sur este, EUA)	Deitiker, 2011
	LOMG	Turquía	Saruhan, 2016

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En nuestra población española de miastenia gravis autoinmune (MG):

1. El complejo génico HLA juega un papel principal como factor de riesgo y modificante de fenotipo en las formas esporádicas de MG. Las variantes de riesgo corresponden al haplotipo AH8.1 y son las mismas que las reportadas en otras poblaciones europeas de origen caucásico. En nuestra cohorte, se han identificado nuevas asociaciones como: 1) las del alelo DQB1*03:01 actuando como posible factor de riesgo en mujeres de inicio precoz con hiperplasia tímica y anti-AChR; a) la del posible efecto protector contra MG de A*24:02 en mujeres; 3) la de los alelos DRB1*07:01 y DQB1*02:02 como posibles modificantes de fenotipo para la edad de debut muy tardío de MG.
2. La prevalencia de formas familiares de MG es de un 3,46%, similar a la de las principales series publicadas en otras poblaciones. Se puede afirmar que en ellas predomina el debut tardío o muy tardío así como una enorme heterogeneidad inter e intrafamiliar. El resto de las características clínicas, serológicas e histopatológicas analizadas son indistinguibles de las formas de MG esporádica.
3. Los alelos HLA-DRB1*03:01 y DQB1*02:01 fueron los más frecuentes en nuestra cohorte de MG familiar. Aunque no se ha podido encontrar una asociación estadísticamente significativa entre los alelos HLA-DQB1*05:03 y DRB1*14:54 y la susceptibilidad a padecer la enfermedad, no se pueden descartar como posibles factores de riesgo para MG familiar en nuestra población.
4. No se ha detectado la mutación patogénica (c.*35A>G) del gen ENOX1 en las formas familiares ni esporádicas de MG. Pero se han identificado nuevas variantes alélicas y haplotipos del gen ENOX1 que postulamos que actuarían como factores de riesgo para la aparición concomitante de timoma (haplotipo CGAC), y como factores modificantes de fenotipo para la edad de debut de la enfermedad (variante rs1044753 y haplotipo CGGC).

La etiopatogenia genética de la MG autoinmune y sus mecanismos moleculares, son con mucha probabilidad sumamente intrincados. Además del complejo HLA, o el gen ENOX1, se requeriría de la participación de otros genes principales desconocidos a día de hoy. Para poder identificar estos nuevos genes, especialmente en formas familiares de MG, existe la necesidad de realizar estudios genéticos multicéntricos para conseguir tamaños muestrales mayores. Estos futuros estudios podrán ayudar a esclarecer el papel de la heredabilidad, así como la correcta identificación de factores de riesgo, susceptibilidad o modificantes de fenotipo responsables de la increíble heterogeneidad fenotípica multidimensional en esta enfermedad.

7. LÍNEAS DE FUTURO

7. LÍNEAS DE FUTURO

A partir de los resultados obtenidos en los proyectos descritos en este trabajo de Tesis Doctoral que han sido expuestos en los apartados anteriores, nuestro grupo de investigación, y la presente doctoranda, consideran que el estudio de los genes HLA reactivado con nuevas técnicas de Next Generation Sequencing es prometedor para evaluar el importante papel del complejo HLA en MG. Actualmente, estamos trabajando en un nuevo proyecto para identificar las variantes genéticas y epigenéticas más prevalentes en la población española de MG, globalmente y en cada uno de los subgrupos fenotípicos analizados.

La realización de este nuevo proyecto financiado por el Instituto Carlos III (PI16/01673) tiene un potencial impacto clínico-asistencial muy relevante. Es posible ejecutarlo gracias a la incorporación de técnicas de secuenciación masiva (NGS), que han permitido reportar nuevas variantes en genes HLA y no-HLA asociados a MG en todo el mundo.

Nuestros objetivos actuales son estudiar las variantes genéticas que están presentes en las regiones exónicas y promotoras de diversos genes candidatos en una cohorte de nuestros pacientes con MG. Esto nos permitirá posteriormente comprobar si en nuestra población global de MG, las variantes identificadas en estos genes predisponen al riesgo de MG, actúan como factores modificadores de fenotipo, pueden ser utilizados como biomarcadores, o si pueden ser "major genes" (en las formas familiares).

Los genes estudiados incluyen el complejo multigénico HLA, genes identificados previamente en estudios de asociación masiva (GWAS) como PTPN22, TNIP1, CTLA4, CTSL2, LGALS1, TNFRS11A o FOXP3, pero también loci específicos como los que codifican las múltiples proteínas implicadas en la unión neuromuscular: CHNRA1, CHRNB1, CHRND, CHRNG y CHRNE en adultos.

Además, se pretende caracterizar epidemiológicamente las variables identificadas en comparación con los hallazgos en otras poblaciones, así como poder determinar la existencia de asociación entre los SNPs analizados y el fenotipo.

Escogiendo un número de SNPs más reducido en base a sus implicaciones funcionales a nivel de proteína, del mRNA o de la región promotora podremos determinar la asociación de los genotipos de las variantes encontradas con la enfermedad o la respuesta al tratamiento farmacológico en nuestros pacientes (farmacogenómica).

Otra línea de investigación que se pretende desarrollar es la determinación de factores epigénéticos que sirvan de marcadores de pronóstico, o de indicación de tratamiento, y que puedan permitir identificar nuevas dianas terapéuticas.

En la actualidad nuestro grupo de investigación participa activamente varios ensayos clínicos con nuevos fármacos para MG, sobretodo biológicos, como el recientemente aprobado Eculizumab o el producto de investigación M281 en fase II, activo en estos momentos.

Dado que se trata de medicamentos efectivos pero con un impacto económico en el gasto sanitario, los avances que pueden suponer los resultados derivados de nuestros trabajos de investigación en farmacogenómica, conjuntamente con los del resto de investigadores en todo el mundo, contribuirán a favorecer una mejor estratificación y selección del paciente en función de sus características intrínsecas, seleccionando a aquellos individuos con formas refractarias de MG o problemas de tolerabilidad y efectos adversos derivados de los fármacos inmunomoduladores.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

A

Aarli JA. Late-onset myasthenia gravis: A changing scene. *Arch Neurol.* 1999;56(1):25-7. PMID: 9923757.

Aarli JA. Myasthenia gravis in the elderly: Is it different? *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:238-43.. PMID: 18567874. DOI: 10.1196/annals.1405.040.

Abicht A, Müller J, Lochmüller H. Congenital Myasthenic Syndromes. Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA et al., editor. *GeneReviews®*. Seattle: University of Washington; 2003 [updated 2016 Jul 14] [accessed on 2019 May 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1168/>. PMID: 20301347.

Aharonov A, Tarrab-Hazdai R, Abramsky O, Fuchs S. Humoral antibodies to acetylcholine receptor in patients with myasthenia gravis. *Lancet.* 1975 23;306(7930):340–2. PMID: 51144.

Akaishi T, Yamaguchi T, Suzuki Y, Nagane Y, Suzuki S, Murai H, et al. Insights into the classification of myasthenia gravis. *PLoS One.* 2014 Sep 5;9(9):e106757. PMID: 25192469. DOI: 10.1371/journal.pone.0106757.

Alahgholi-Hajibehzad M, Yilmaz V, Gülsen-Parman Y, Aysal F, Oflazer P, Deymeer F, et al. Association of HLA-DRB1*14, -DRB1*16 and -DQB1*05 with MuSK-myasthenia gravis in patients from Turkey. *Hum Immunol.* 2013;74(12):1633–5. PMID: 23993985. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.08.271.

Alkhwajah NM, Oger J. Late-onset myasthenia gravis: A review when incidence in older adults keeps increasing. *Muscle and Nerve.* 2013;48(5):705–10. PMID: 23893883. DOI: 10.1002/mus.23964.

Appel SH, Almon RR LN. Acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. *N Engl J Med.* 1975;293(15):760–1. PMID: 1160955. DOI: 10.1056/NEJM197510092931508.

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 Mar 25;60(6):1024–6. PMID: 12654975. DOI: 10.1212/01.wnl.0000050461.05432.c5.

Aswad F, Kawamura H, Dennert G. High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory Tcells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol.* 2005;175(5):3075-83. PMID: 16116196. DOI: 10.4049/jimmunol.175.5.3075.

Avidan N, Le Panse R, Berrih-Aknin S, Miller A. Genetic basis of myasthenia gravis - A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2014 Aug;52:146-53. PMID: 24361103. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.12.001.

B

Bachinski LL, Udd B, Meola G, Sansone V, Bassez G, Eymard B, et al. Confirmation of the Type 2 Myotonic Dystrophy (CCTG) Expansion Mutation in Patients with Proximal Myotonic Myopathy/Proximal Myotonic Dystrophy of Different European Origins: A Single Shared Haplotype Indicates an Ancestral Founder Effect. *Am J Hum Genet.* 2003 Oct;73(4):835-48. PMID: 12970845. DOI: 10.1086/378566.

Barohn RJ, McIntire D, Herbelin L, Wolfe GI, Nations S, Bryan WW. Reliability testing of the quantitative myasthenia gravis score. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc.; 1998. p. 769–72. PMID: 9668327.

Bartoccioni E, Scuderi F, Augugliaro A, Chiatamone Ranieri S, Sauchelli D, Alboino P, et al. HLA class II allele analysis in MuSK-positive myasthenia gravis suggests a role for DQ5. *Neurology*. 2009;72(2):195–7. PMID: 19139372. DOI: 10.1212/01.wnl.0000339103.08830.86.

Bergoffen J, Zmijewski C, Fischbeck K. Familial autoimmune myasthenia gravis. *Neurology*. 1994;44:551–4. PMID: 7908425. DOI: 10.1212/wnl.44.3_part_1.551.

Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun*. 2014 Aug;52:90-100. PMID: 24389034. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.12.011.

Berrih-Aknin S, Panse RL, Dragin N. AIRE: a missing link to explain female susceptibility to autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci*. 2018;1412(1):21-32. PMID: 29291257. DOI: 10.1111/nyas.13529.

Bitao B, Mingshan Y, Jinzhi X, Feili G, Xiaodan J, Xiaobo N. The clinical study and HLA genotyping of 112 familial myasthenia gravis patients. *J Tongji Med Univ*. 2010;19(1):46–9. PMID: 12840875.

Bodmer WF. The HLA system and disease. The Oliver Sharpey Lecture 1979. *J R Coll Physicians Lond*. 1980;14(1):43–50.

Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan MA, Selmi C, et al. Twin studies in autoimmune disease: Genetics, gender and environment. *J Autoimmun*. 2012 May;38(2-3):J156-69. PMID: 22177232. DOI: 10.1016/j.jaut.2011.11.003.

Bunce M, Passey B. HLA Typing by Sequence-Specific Primers BT - Transplantation Immunology: Methods and Protocols. In: Zachary AA, Leffell MS, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2013;147–59. DOI: 10.1007/978-1-62703-493-7_8

Burns TM, Conaway M, Sanders DB. The MG Composite: A valid and reliable outcome measure for myasthenia gravis. *Neurology*. 2010;74(18):1434–40. PMID: 20439845. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181dc1b1e.

Burns TM, Grouse CK, Wolfe GI, Conaway MR, Sanders DB. The MG-QOL15 for following the health-related quality of life of patients with myasthenia gravis. *Muscle and Nerve*. 2011;43(1):14–8. PMID: 21082698 DOI: 10.1002/mus.21883.

C

Cargou M, Elsermans V, Top I, Guidicelli G, Visentin J. Characterization of the novel HLA-A*03:315 allele by sequencing-based typing. *HLA*. 2019;93(1):39–40. PMID: 30421532 DOI: 10.1111/tan.13420.

Carlsson B, Wallin J, Pirskanen R, Matell G, Smith CIE. Different HLA DR-DQ associations in subgroups of idiopathic myasthenia gravis. *Immunogenetics*. 1990;31(5–6):285–90. PMID: 1973409.

Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO, McConville J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol*. 2010;10:46. PMID: 20565885. DOI: 10.1186/1471-2377-10-46

Chae JH, Vasta V, Cho A, Lim BC, Zhang Q, Eun SH, et al. Utility of next generation sequencing in genetic diagnosis of early onset neuromuscular disorders. *J Med Genet*. 2015;52(3):208-16. PMID: 25635128. DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102819.

Chan SH, Tan CB, Lin YN, Wee GB, Degli-Esposti MA, Dawkins RL. HLA and singaporean Chinese myasthenia gravis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;101(2):119–25. PMID: 8508049. DOI: 10.1159/000236508.

Chen J, Bacanu SA, Yu H, Zhao Z, Jia P, Kendler KS, et al. Genetic Relationship between Schizophrenia and Nicotine Dependence. *Sci Rep*. 2016 May 10;6:25671. PMID: 27164557. DOI: 10.1038/srep25671.

Chen Y, Wang W, Wei D, Yang L. Three cases of myasthenia gravis from one family with variations in clinical features and serum antibodies. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(3):286–8. PMID: 22082588. DOI: 10.1016/j.nmd.2011.10.004.

Closa L, Vidal F, Herrero MJ, Caro JL. Design and Validation of a Multiplex KIR and HLA Class I Genotyping Method Using Next Generation Sequencing. *Front Immunol*. 2018 Dec 19;9:2991. PMID: 30619344. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02991.

Compston DAS, Vincent A, Newsom-davis J, Batchelor JR. Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain*. 1980;103(3):579–601. PMID: 6968236. DOI: 10.1093/brain/103.3.579.

Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: Past, present, and future. Vol. 116, *Journal of Clinical Investigation*. 2006. p. 2843–54. PMID: 17080188. DOI: 10.1172/JCI29894.

Corda D, Deiana GA, Mulargia M, Pirastru MI, Serra M, Piluzza MG, et al. Familial autoimmune MuSK positive myasthenia gravis. *J Neurol*. 2011;258(8):1559–60. PMID: 21369718. DOI: 10.1007/s00415-011-5964-6.

D

Dalakas MC. Immunotherapy in myasthenia gravis in the era of biologics. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(2):113–24. PMID: 30573759. DOI: 10.1038/s41582-018-0110-z.

Dalva K, Beksac M. HLA Typing with Sequence-Specific Oligonucleotide Primed PCR (PCR-SSO) and Use of the Luminex™ Technology BT - Bone Marrow and Stem Cell Transplantation. In: Beksac M, editor. *New York, NY: Springer New York; 2014. p. 87–99. PMID: 24473780. DOI: 10.1007/978-1-4614-9437-9_6.*

Dausset J. The major histocompatibility complex in man. *Science*. 1981;213(4515):1469–74. PMID: 6792704.

Deitiker PR, Oshima M, Smith RG, Mosier D, Atassi MZ. Association with HLA DQ of early onset myasthenia gravis in Southeast Texas region of the United States. *Int J Immunogenet*. 2011 Jan;38(1):55–62. PMID: 21108743. DOI: 10.1111/j.1744-313X.2010.00979.x.

Deminatti MM, Ribet M, Gosselin B, Bauters F, Menciaer E, Savary JB, et al. [Familial thymoma and translocation t (14;20) (q24;p13)]. *Ann Genet*. 1994;37(2):72–4. PMID: 7985981.

Detterbeck FC, Nicholson AG, Kondo K, Van Schil P, Moran C. The Masaoka-Koga Stage Classification for Thymic Malignancies: Clarification and Definition of Terms. *J Thorac Oncol*. 2011;6(7):S1710–6. PMID: 21847052. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31821e8cff.

Dhillon S. Eculizumab: A Review in Generalized Myasthenia Gravis. *Drugs*. 2018;78(3):367–76. PMID: 29435915. DOI: 10.1007/s40265-018-0875-9.

Divers J, Palmer ND, Lu L, Langefeld CD, Rocco M V., Hicks PJ, et al. Gene-gene interactions in APOL1-associated nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(3):587–94. PMID: 24157943. DOI: 10.1093/ndt/gft423.

Dias-Tosta E, Morato-Fernandez RN, Villaça JA. Estudo da correlação HLA e miastenia gravis em uma população brasileira [Correlation of HLA and myasthenia gravis in a Brazilian population]. *Arq Neuropsiquiatr*. 1990;48(1):49–54. PMID: 2378575.

Djabiri F, Caillat-Zucman S, Gajdos P, Jaïs JP, Gomez L, Khalil I, et al. Association of the AChR α -subunit gene (CHRNA), DQA1*0101, and the DR3 haplotype in myasthenia gravis. Evidence for a three-gene disease model in a subgroup of patients. *J Autoimmun.* 1997;10(4):407–13. PMID: 9237805. DOI: 10.1006/jaut.1997.0140.

Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2018;19(7):665–73. PMID: 29925983. DOI: 10.1038/s41590-018-0120-4.

Drachman DB. Myasthenia Gravis. *Semin Neurol.* 2016;36:419–24. PMID: 27704496. DOI: 10.1055/s-0036-1586265.

E

Ehsan S, Amirzargar A, Yekaninejad MS, Mahmoudi M, Mehravar S, Moradi B, et al. Association of HLA class II (DRB1, DQA1, DQB1) alleles and haplotypes with myasthenia gravis and its subgroups in the Iranian population. *J Neurol Sci.* 2015;359(1–2):335–42. PMID: 26671138. DOI: 10.1016/j.jns.2015.11.021.

Engel AG. Genetic basis and phenotypic features of congenital myasthenic syndromes. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2018. p. 565–89. PMID: 29478601. DOI: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00037-5.

Evoli A, Alboini PE, Damato V, Iorio R, Provenzano C, Bartoccioni E, et al. Myasthenia gravis with antibodies to MuSK: An update. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1412(1):82-89. PMID: 29266255. DOI: 10.1111/nyas.13518.

Evoli A, Batocchi AP, Zelano G, Uncini A, Palmisani MT, Tonali P. Familial autoimmune myasthenia gravis: Report of four families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995;58(6):729–31. PMID: 7608676. DOI: 10.1136/jnnp.58.6.729.

F

Fang F, Sveinsson O, Thormar G, Granqvist M, Askling J, Lundberg IE, et al. The autoimmune spectrum of myasthenia gravis: A Swedish population-based study. *J Intern Med.* 2015 M;277(5):594–604. PMID: 25251578. DOI: 10.1111/joim.12310.

Fekih-Mrissa N, Klai S, Zaouali J, Gritli N, Mrissa R. Association of HLA-DR/DQ polymorphism with myasthenia gravis in Tunisian patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115(1):32–6. PMID: 22521184. DOI: 10.1016/j.clineuro.2012.04.001.

Feltkamp TEW, Nijenhuis LE, Engelfriet CP, Rossum ALVAN, Loghem JJVAN, Oosterhuis HJGH. Myasthenia Gravis , Autoantibodies , and HL-A Antigens. *Br Med J.* 1974;1(5899):131–3. PMID: 4544224. DOI: 10.1136/bmj.1.5899.131.

Feng HY, Liu WB, Luo CM, Yang LX, Fang W, Qiu L, et al. A retrospective review of 15 patients with familial myasthenia gravis over a period of 25 years. *Neurol Sci.* 2012;33(4):771-7. PMID: 22057263. DOI: 10.1007/s10072-011-0818-7.

Feng HY, Yang LX, Liu WB, Huang X, Qiu L, Li Y. The HLA-B*4601-DRB1*0901 haplotype is positively correlated with juvenile ocular myasthenia gravis in a southern Chinese Han population. *Neurol Sci.* 2015;36(7):1135–40. PMID: 25953150. DOI: 10.1007/s10072-015-2235-9.

Fernández O, Fernández V, Martínez-Cabrera V, Mayorga C, Alonso A, León A, et al. Multiple sclerosis in Gypsies from southern Spain: Prevalence, mitochondrial DNA haplogroups and HLA class II association. *Tissue Antigens.* 2008;71(5):426–33. PMID: 18312478. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2008.01016.x.

Fritze D, Herrmann C, Smith G, Walpord R. HL-A types in myasthenia gravis. Vol. 302, The Lancet. 1973. p. 211. PMID: 4124299.

Fritze D, Naeim F, Herrman C, Smith G, Walford R. HL-A antigens in myasthenia gravis. Lancet. 1974 Feb 16 [cited 2018 Feb 17];303(7851):240–3. PMID: 4130248.

G

Gajdos P, Chevret S, Clair B, Tranchant C, Chastang C. Plasma exchange and intravenous immunoglobulin in autoimmune myasthenia gravis. Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:720-6. PMID: 9668320.

Gallardo E, Martínez-Hernández E, Titulaer MJ, Huijbers MG, Martínez MA, Ramos A, et al. Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis. Autoimmun Rev. 2014 Oct;13(10):1003-7. PMID: 25193850. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.08.039.

Gamez J. Intravenous immunoglobulin for preparing myasthenia gravis patients for thymectomy and other surgical procedures preventing myasthenic crisis. Clin Exp Immunol. 2014;178 Suppl 1:134-5. PMID: 25546793. DOI: 10.1111/cei.12542.

Gamez J, Salvado M, Casellas M, Manrique S, Castillo F. Intravenous immunoglobulin as monotherapy for myasthenia gravis during pregnancy. J Neurol Sci. 2017;383:118–22. PMID: 29246598. DOI: 10.1016/j.jns.2017.10.037.

García-Ramos G, Téllez-Zenteno JF, Zapata-Zúñiga M, Yamamoto-Furusho JK, Ruiz-Morales JA, Villarreal-Garza C, et al. HLA class II genotypes in Mexican Mestizo patients with myasthenia gravis. Eur J Neurol. 2003;10(6):707–10. PMID: 14641517.

Gauderman, WJ; Morrison J. <http://biostats.usc.edu/Quanto.html>. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies. 2006.

Gilhus NE, Owe JF, Hoff JM, Romi F, Skeie GO, Aarli JA. Myasthenia gravis: A review of available treatment approaches. Autoimmune Dis. 2011;2011:847393. PMID: 22007295. DOI: 10.4061/2011/847393.

Gilhus NE. Myasthenia Gravis. N Engl J Med. 2016;375(26):2570–81. PMID: 28029925. DOI: 10.1056/NEJMra1602678.

Giraud M, Beaurain G, Yamamoto AM, Eymard B, Tranchant C, Gajdos P, et al. Linkage of HLA to myasthenia gravis and genetic heterogeneity depending on anti-titin antibodies. Neurology. 2001;57(9):1555–60. PMID: 11706089. DOI: 10.1212/wnl.57.9.1555.

Giraud M, Eymard B, Tranchant C, Gajdos P, Garchon HJ. Association of the gene encoding the δ -subunit of the muscle acetylcholine receptor (CHRND) with acquired autoimmune myasthenia gravis. Genes Immun. 2004;5(1):80-3. PMID: 14735155. DOI: 10.1038/sj.gene.6364041

Giraud M, Vandiedonck C, Garchon HJ. Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis. Ann N Y Acad Sci. 2008;1132:180-92. PMID: 18567868. DOI: 10.1196/annals.1405.027.

Goldstein G, Manganaro A. Thymin: a thymic polypeptide causing the neuromuscular block of myasthenia gravis. Ann N Y Acad Sci. 1971;183:230–40. PMID: 5287825.

González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. Bioinformatics. 2007;23(5):644–5. PMID: 17267436. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm025.

Gray C et al. Immunopaedia | Advancing Global Immunology Education [accessed 2019 May 25]. Available from: www.immunopaedia.org.za.

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. PMID: 23055271. DOI: 10.1002/ana.23691.

Greve B, Hoffmann P, Illes Z, Rozsa C, Berger K, Weissert R, et al. The autoimmunity-related polymorphism PTPN22 1858C/T is associated with anti-titin antibody-positive myasthenia gravis. *Hum Immunol*. 2009;70(7):540-2. PMID: 19406179. DOI: 10.1016/j.humimm.2009.04.027.

H

Hajeer AH, Sawidan F Al, Bohlega S, Saleh S, Sutton P, Shubaili A, et al. HLA class I and class II polymorphisms in Saudi patients with myasthenia gravis. *Int J Immunogenet*. 2009;36(3):169–72. PMID: 19490212. DOI: 10.1111/j.1744-313X.2009.00843.x.

Heckmann JM, Morrison KE, Emeryk-Szajewska B, Strugalska H, Bergoffen JA, Willcox N, et al. Human muscle acetylcholine receptor alpha-subunit gene (CHRNA1) association with autoimmune myasthenia gravis in Black, Mixed-Ancestry and Caucasian subjects. *J Autoimmun*. 1996;9(2):175-80. PMID: 8738961. DOI: 10.1006/jaut.1996.0021

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. PMID: 21387385. DOI: 10.1002/ana.22312.

Hirunagi T, Tsujikawa K, Hasegawa Y, Mano K, Katsuno M. Elderly-onset familial myasthenia gravis in two siblings. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(6):347–9. PMID: 27132121. DOI: 10.1016/j.nmd.2016.03.005.

Hjelmström P, Giscombe R, Lefvert AK, Pirskanen R, Kockum I, Landin-Olsson M, et al. Different HLA-DQ are positively and negatively associated in Swedish patients with myasthenia gravis. *Autoimmunity*. 1995;22(1):59–65. PMID: 8882423.

Honeybourne D, Dyer P, Mohr PD. Familial myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1982;45(9):854–6. PMID: 7131024. DOI: 10.1136/jnnp.45.9.854.

Hong Y, Li HF, Romi F, Skeie GO, Gilhus NE. HLA and MuSK-positive myasthenia gravis: A systemic review and meta-analysis. *Acta Neurol Scand*. 2018;138(3):219–26. PMID: 29736936. DOI: 10.1111/ane.12951.

Horiki T, Inoko H, Moriuchi J, Ichikawa Y, Arimori S. Combinations of HLA-DPBI and HLA-DQB1 alleles determine susceptibility to early-onset myasthenia gravis in Japan. *Autoimmunity*. 1994;19(1):49–54. PMID: 7749041.

Howard JF, Utsugisawa K, Benatar M, Murai H, Barohn RJ, Illa I, et al. Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Lancet Neurol*. 2017;16(12):976–86. PMID: 29066163. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30369-1.

Howard JF, Sanders DB, Massey JM. The Electrodiagnosis of Myasthenia Gravis and the Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Neurol Clin*. 1994 May;12(2):305-30. PMID: 8041344.

Hughes T. The early history of myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord*. 2005;15(12):878–86. PMID: 16289896. DOI: 10.1016/j.nmd.2005.08.007.

I

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9. PMID: 21833088. DOI: 10.1038/nature10251.

J

Janeway C. *Inmunobiología. El Sistema Inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2nd ed. Barcelona: Masson; 2003.

Jaretzki A, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keesey JC, Penn AS, et al. Myasthenia gravis: Recommendations for clinical research standards. *Neurology*. 2000 Jul 12;55(1):16-23. PMID: 10891897. DOI: 10.1212/wnl.55.1.16.

Jiang Z, Gorenstein NM, Morré DM, James Morré D. Molecular cloning and characterization of a candidate human growth-related and time-keeping constitutive cell surface hydroquinone (NADH) oxidase. *Biochemistry*. 2008;47(52):14028–38. PMID: 19055324. DOI: 10.1021/bi801073p.

K

Kallon D. <http://www.histocompatibilityandimmunogenetics.com> Histocompatibility and immunogenetics, a collection of brief revision notes. London; 2011.

Kanai T, Uzawa A, Kawaguchi N, Sakamaki T, Yoshiyama Y, Himuro K, et al. HLA-DRB1*14 and DQB1*05 are associated with Japanese anti-MuSK antibody-positive myasthenia gravis patients. *J Neurol Sci*. 2016;363:116–8. PMID: 27000234. DOI: 10.1016/j.jns.2016.02.031.

Klein J. The HLA system. *New Engl J Med Rev*. 2000;343(10):702–9. PMID: 10974135. DOI: 10.1056/NEJM200009073431006

Kuks JBM. Clinical aspects of myasthenia gravis. In: Kaminski H, editor. *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. 2nd ed. New York: Humana Press Springer Science; 2009. p. 79–94.

Kusner LL, Sengupta M, Kaminski HJ. Acetylcholine receptor antibody-mediated animal models of myasthenia gravis and the role of complement. *Ann N Y Acad Sci*. 2018 Feb;1413(1):136-142. PMID: 29356015. DOI: 10.1111/nyas.13555.

L

Landouré G, Knight MA, Stanescu H, Taye AA, Shi Y, Diallo O, et al. A candidate gene for autoimmune myasthenia gravis. *Neurology*. 2012;79(4):342–7. PMID: 22744667. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318260cbd0.

Lanford J, Philips L. Epidemiology and genetics of myasthenia gravis. In: Kaminski HJ, editor. *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. 2nd ed. New York: Humana Press Springer Science; 2009. p. 71–8.

Larsen CE, Alper CA. The genetics of HLA-associated disease. *Curr Opin Immunol*. 2004 Oct;16(5):660-7. PMID: 15342014. DOI: 10.1016/j.coi.2004.07.014.

Latham K, Little A-M, Madrigal JA. An Overview of HLA Typing for Hematopoietic Stem Cell Transplantation BT - Bone Marrow and Stem Cell Transplantation. In: Beksaç M, editor. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 73–85.: 10.1007/978-1-4614-9437-9_5.

Lavrnjic D, Nikolic A, De Baets M, Verschuuren J, Verduyn W, Losen M, et al. Familial occurrence of autoimmune myasthenia gravis with different antibody specificity. *Neurology*. 2008;70(21):2011–3. PMID: 18490624. DOI: 10.1212/01.wnl.0000312514.66164.88.

Lefvert AK, Zhao Y, Ramanujam R, Yu S, Pirskanen R, Hammarström L. PTPN22 R620W promotes production of anti-AChR autoantibodies and IL-2 in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2008 Jul 15;197(2):110-3. PMID: 18533277. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.004.

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. PMID: 18515870. DOI: 10.1093/brain/awn092.

Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs. *J Exp Med*. 1975;141(6):1365–75. PMID: 1127382. DOI: 10.1084/jem.141.6.1365.

Lennon VA. The immunopathology of myasthenia gravis. *Hum Pathol*. 1978;9(5):541–51. PMID: 309428.

Li HF, Hong Y, Zhang X, Xie Y, Skeie GO, Hao HJ, et al. Gene Polymorphisms for Both Auto-antigen and Immune-Modulating Proteins Are Associated with the Susceptibility of Autoimmune Myasthenia Gravis. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4771–80. PMID: 27501803. DOI: 10.1007/s12035-016-0024-y.

Liang G, Gu Z, Li Y, Fu J, Shen Y, Wei Y, et al. Comparison of the Masaoka-Koga staging and the International Association for the Study of Lung Cancer/the International Thymic Malignancies Interest Group proposal for the TNM staging systems based on the Chinese Alliance for Research in Thymomas retrospective database. *J Thorac Dis*. 2016;8(4):727–37. PMID: 27114841. DOI: 10.21037/jtd.2016.03.22.

Lindstrom J. An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1977;7(1):36–43. PMID: 852152.

Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. 1975. *Neurology*. 1998 Oct;51(4):933-9. PMID: 9781505. DOI: 10.1212/wnl.51.4.933-a.

Ling LE, Hillson JL, Tiessen RG, Bosje T, van Iersel MP, Nix DJ, et al. M281, an Anti-FcRn Antibody: Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, and Safety Across the Full Range of IgG Reduction in a First-in-Human Study. *Clin Pharmacol Ther*. 2019 Apr;105(4):1031-1039. PMID: 30402880. DOI: 10.1002/cpt.1276.

Little AM, Parham P. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet*. 1999;1:105–23. PMID: 11256568.

López Herráez D, Martínez-Bueno M, Riba L, García de la Torre I, Sacnún M, Goñi M, et al. Rheumatoid arthritis in Latin Americans enriched for Amerindian ancestry is associated with loci in chromosomes 1, 12, and 13, and the HLA class II region. *Arthritis Rheum*. 2013;65(6):1457-67. PMID: 23460240. DOI: 10.1002/art.37923.

M

Machens A, Löliger C, Pichlmeier U, Emskötter T, Busch C, Izbicki JR. Correlation of thymic pathology with HLA in myasthenia gravis. *Clin Immunol*. 1999;91(3):296–301. PMID: 10370374. DOI: 10.1006/clim.1999.4710.

Maiers M, Gragert L, Klitz W. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Hum Immunol*. 2007;68(9):779–88. PMID: 17869653. DOI: 10.1016/j.humimm.2007.04.005

Maldonado-Montoro M, Cañadas-Garre M, González-Utrilla A, Plaza-Plaza JC, Calleja-Hernández MÁ. Genetic and clinical biomarkers of tocilizumab response in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res.* 2016;111:264–71. PMID: 27339827. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.06.016.

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.. PMID: 22590574. DOI: 10.1371/journal.pone.0036603.

Mao ZF, Yang LX, Mo XA, Qin C, Lai YR, He NY, et al. Frequency of autoimmune diseases in myasthenia gravis: A systematic review. *Int J Neurosci.* 2011 Mar;121(3):121-9. PMID: 21142828. DOI: 10.3109/00207454.2010.539307.

Marrie RA, Sahlas DJ, Bray GM. Familial autoimmune myasthenia gravis: Four patients involving three generations. *Can J Neurol Sci.* 2000;27(4):307–10. PMID: 11097521.

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens.* 2010;75(4):291-455. PMID: 20356336. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x.

Marx A, Chan JKC, Coindre J-M, Detterbeck F, Girard N, Harris NL, et al. The 2015 WHO Classification of Tumors of the Thymus: Continuity and Changes. *J Thorac Oncol.* 2015;10(10):1383-95. PMID: 26295375. DOI:10.1097/JTO.0000000000000654.

Masaoka A. Staging system of thymoma. *J Thorac Oncol.* 2010;5(10 Suppl 4):S304-12. PMID: 20859124. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181f20c05.

Massa R, Greco G, Testi M, Rastelli E, Terracciano C, Frezza E, et al. Thymomatous myasthenia gravis: novel association with HLA DQB1*05:01 and strengthened evidence of high clinical and serological severity. *J Neurol.* 2019;266(4):982–9. PMID: 30741378. DOI: 10.1007/s00415-019-09225-z.

Matani A, Dristsas C. Familial occurrence of thymoma. *Arch Pathol.* 1973;95:90–1. PMID: 4683164.

Matsuki K, Juji T, Tokunaga K, Takamizawa M, Maeda H, Soda M, et al. HLA antigens in Japanese patients with myasthenia gravis. *J Clin Invest.* 1990;86(2):392–9. PMID: 1974553. DOI: 10.1172/JCI114724.

Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol.* 2009 May;8(5):475-90. PMID: 19375665. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70063-8.

Meyer A, Levy Y. Geoepidemiology of myasthenia gravis. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A383-6. PMID: 19922815 DOI: 10.1016/j.autrev.2009.11.011

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215–1215. PMID: 3344216. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215.

Montoya-Ortiz G. Immunosenescence, aging, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2013;2013:267078. PMID: 24260712. DOI: 10.1155/2013/267078.

Morré DJ, Morré DM. Cell surface NADH oxidases (ECTO-NOX proteins) with roles in cancer, cellular time-keeping, growth, aging and neurodegenerative diseases. *Free Radic Res.* 2003 Aug;37(8):795-808. PMID: 14567438.

Muppidi S, Utsugisawa K, Benatar M, Murai H, Barohn RJ, Illa I et al. Regain Study Group. Long-term safety and efficacy of eculizumab in generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve.* 2019 Feb 14. PMID: 30767274. DOI: 10.1002/mus.26447.

Murai H, Yamashita N, Watanabe M, Nomura Y, Motomura M, Yoshikawa H, et al. Characteristics of myasthenia gravis according to onset-age: Japanese nationwide survey. *J Neurol Sci.* 2011;305(1-2):97-102. PMID: 21440910. DOI: 10.1016/j.jns.2011.03.004

N

Na SJ, Lee JH, Kim SW, Kim DS, Shon EH, Park HJ, et al. Whole-genome analysis in Korean patients with autoimmune myasthenia gravis. *Yonsei Med J.* 2014;55(3):660-8. PMID: 24719132. DOI: 10.3349/ymj.2014.55.3.660.

Nacu A, Andersen JB, Lisnic V, Owe JF, Gilhus NE. Complicating autoimmune diseases in myasthenia gravis: A review. *Autoimmunity.* 2015;48(6):362-8. PMID: 25915571. DOI: 10.3109/08916934.2015.1030614.

Naeim F, Keesey JC, Herrmann C, Lindstrom J, Zeller E, Walford RL. Association of HLA—B8, DRw3, and Anti - Acetylcholine Receptor Antibodies in Myasthenia Gravis. *Tissue Antigens.* 1978;12(5):381-6. PMID: 85353.

Namba T, Brunner NG, Brown SB, Muguruma M, Grob D. Familial Myasthenia Gravis: Report of 27 Patients in 12 Families and Review of 164 Patients in 73 Families. *Arch Neurol.* 1971;25(1):49-60. PMID: 5146412.

Nastuk WL, Strauss AJL, Osserman KE. Search for a neuromuscular blocking agent in the blood of patients with myasthenia gravis. *Am J Med.* 1959 Mar;26(3):394-409. PMID: 13626994.

Newsom-Davis J, Willcox N, Schluep M, Harcourt G, Vincent A, Mossman S, et al. Immunological heterogeneity and cellular mechanisms in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;505:12-26. PMID: 2825574.

Nicodème F, Geffroy S, Conti M, Delobel B, Soenen V, Gardel N, et al. Familial occurrence of thymoma and autoimmune diseases with the constitutional translocation t(14;20)(q24.1;p12.3). *Genes Chromosom Cancer.* 2005;44(2):154-60. PMID: 15942943. DOI: 10.1002/gcc.20225.

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. PMID: 16769963. DOI: 10.1212/01.wnl.0000218159.79769.5c.

Nong T, Saito K, Blair L, Tarsitani C, Lee J-H. KIR genotyping by reverse sequence-specific oligonucleotide methodology. *Tissue Antigens.* 2007 Apr;69:92-5. PMID: 17445176. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2006.762_3.x.

O

Oger J, Frykman H. An update on laboratory diagnosis in myasthenia gravis. *Clin Chim Acta.* 2015 Sep 20;449:43-8. PMID: 26238187. DOI: 10.1016/j.cca.2015.07.030.

Oh SJ, Cho HK. Edrophonium responsiveness not necessarily diagnostic of myasthenia gravis. *Muscle Nerve.* 1990;13(3):187-91. PMID: 2320039. DOI: 10.1002/mus.880130302.

Osserman KE, Kaplan LI. Rapid diagnostic test for myasthenia gravis: Increased muscle strength, without fasciculations, after intravenous administration of edrophonium (Tensilon®) chloride. *J Am Med Assoc.* 1952;150(4):265-8. PMID: 14955435.

P

Pappas DJ, Marin W, Hollenbach JA, Mack SJ. Bridging ImmunoGenomic Data Analysis Workflow Gaps (BIGDAWG): An integrated case-control analysis pipeline. *Hum Immunol.* 2016;77(3):283–7. PMID: 26708359. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.12.006.

Pascuzzi RM, Sermas A, Phillips LH, Johns TR. Familial autoimmune myasthenia gravis and thymoma: Occurrence in two brothers. *Neurology.* 1986 May 13;36(3):423–7. PMID: 3951715. DOI: 10.1212/wnl.36.3.423.

Pevzner A, Schoser B, Peters K, Cosma NC, Karakatsani A, Schalke B, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibodynegative myasthenia gravis. *J Neurol.* 2012;259(3):427–35. PMID: 21814823. DOI: 10.1007/s00415-011-6194-7.

Pirskanen R. Genetic aspects in myasthenia gravis: A Family Study of 264 Finnish Patients. *Acta Neurol Scand.* 1977;56(5):365–88. PMID: 596124.

Pirskanen R. Genetic associations between myasthenia gravis and HLA system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1976;39(1974):23–33. PMID: 1255208. DOI: 10.1136/jnnp.39.1.23.

Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev.* 1999;167(1):257–74. PMID: 10319267.

Ponseti JM, Gamez J, Azem J, Fort JM, López-Cano M, Vilallonga R, et al. Post-thymectomy combined treatment of prednisone and tacrolimus versus prednisone alone for consolidation of complete stable remission in patients with myasthenia gravis: a non-randomized, non-controlled study. *Curr Med Res Opin.* 2007;23(6):1269-78. PMID: 17559724. DOI: 10.1185/030079907X188080.

Ponseti JM, Gamez J, Azem J, López-Cano M, Vilallonga R, Armengol M. Tacrolimus for myasthenia gravis: a clinical study of 212 patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:254-63. PMID: 18096852 DOI: 10.1196/annals.1405.000.

Ponseti JM, Azem J, Fort JM, López-Cano M, Vilallonga R, Gamez J, et al. Experience with starting tacrolimus postoperatively after transsternal extended thymectomy in patients with myasthenia gravis. *Curr Med Res Opin.* 2006;22(5):885-95. PMID: 16709310. DOI: 10.1185/030079906X104650.

Ponseti JM, Caritg N, Gamez J, López-Cano M, Vilallonga R, Armengol M. A comparison of long-term post-thymectomy outcome of anti-AChR-positive, anti-AChR-negative and anti-MuSK-positive patients with non-thymomatous myasthenia gravis. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(1):1-8. PMID: 19063688. DOI: 10.1517/14712590802588831.

Ponseti JM, Gamez J, Vilallonga R, Ruiz C, Azem J, López-Cano M, et al. Influence of ectopic thymic tissue on clinical outcome following extended thymectomy in generalized seropositive nonthymomatous myasthenia gravis. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34(5):1062-7. PMID: 18760934. DOI: 10.1016/j.ejcts.2008.07.049.

Popperud TH, Viken MK, Kerty E, Lie BA. Juvenile myasthenia gravis in Norway: HLA-DRB1*04:04 is positively associated with prepubertal onset. *PLoS One.* 2017;12(10). PMID: 29036181. DOI: 10.1371/journal.pone.0186383.

Provenzano C, Arancio O, Evoli A, Rocca B, Bartocioni E, Grandis D De, et al. Familial autoimmune myasthenia gravis with different pathogenetic antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1988;51(9):1228–30. PMID: 3225607. DOI: 10.1136/jnnp.51.9.1228.

Pujol-Borrell R, Herrero-Mata MJ, Palou E, Armengol MP. Immunological senescence and thymic function in transplantation. *Transplantation.* 2009 Aug 15;88(3 Suppl):S8-13. PMID: 19667967. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181af653c.

R

Renton AE, Pliner HA, Provenzano C, Evoli A, Ricciardi R, Nalls MA, et al. A genome-wide association study of myasthenia gravis. *JAMA Neurol.* 2015;72(4):396–404. PMID: 25643325. DOI: 10.1001/jamaneurol.2014.4103.

Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: Allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(D1):D423–31. PMID: 25414341. DOI: 10.1093/nar/gku1161.

Rotstein DL, Bril V. A family with myasthenia gravis with and without thymoma. *Canadian Journal of Neurological Sciences.* 2012;39(4):539–40. PMID: 22728868.

Rudilla F, Vidal F, Herrero M, Palou E, Corrales I, Borrás N, et al. Validation and implementation of next generation sequencing technology for HLA typing in our laboratory routine. In: 4th European Congress of Immunology, Vienna. 2015.

Ryder LP, Svejgaard A, Dausset J. Genetics of HLA Disease Association. *Annu Rev Genet.* 2003;15(1):169–87. PMID: 7039493. DOI: 10.1146/annurev.ge.15.120181.001125.

S

Sagar HJ, Gelsthorpe K, Milford-Ward A, Davies-Jones GAB. Clinical and immunological associations in myasthenia gravis 1: Autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1980;43(11):967–70. PMID: 6969294. DOI: 10.1136/jnnp.43.11.967.

Sagar HJ, Davies-Jones GAB, Allonby ID. Clinical and immunological associations in myasthenia gravis 2: Cell-mediated immunity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1980;43(11):971–7. PMID: 6969295. DOI: 10.1136/jnnp.43.11.971.

Santos E, Bettencourt A, da Silva AM, Boleixa D, Lopes D, Brás S, et al. HLA and age of onset in myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(7):650–654. PMID: 28495048. DOI: 10.1016/j.nmd.2017.04.002.

Sakai W, Matsui N, Ishida M, Furukawa T, Miyazaki Y, Fujita K, et al. Late-onset myasthenia gravis is predisposed to become generalized in the elderly. *eNeurologicalSci.* 2016;2:17–20. PMID: 29473057. DOI: 10.1016/j.ensci.2016.02.004.

Salvado M, Canela M, Ponseti JM, Lorenzo L, Garcia C, Cazorla S, et al. Study of the prevalence of familial autoimmune myasthenia gravis in a Spanish cohort. *J Neurol Sci.* 2016;360:110–4. PMID: 26723985. DOI: 10.1016/j.jns.2015.11.049.

Sanders DB, Stålberg E V. AAEM minimonograph 25: Single-fiber electromyography. *Muscle Nerve.* 1996;19(9):1069–83. PMID: 8761262 DOI: 10.1002/(SICI)1097-4598(199609)19:9<1069::AID-MUS1>3.0.CO;2-Y.

Sanders DB, Wolfe GI, Narayanaswami P, Benatar M, Evoli A, Gilhus N, et al. Developing treatment guidelines for myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1412(1):95–101. PMID: 29381223. DOI: 10.1111/nyas.13537.

Saruhan-Direskeneli G, Hughes T, Yilmaz V, Durmus H, Adler A, Alahgholi-Hajibehzad M, et al. Genetic heterogeneity within the HLA region in three distinct clinical subgroups of myasthenia gravis. *Clin Immunol.* 2016;166–167:81–8. PMID: 27181991. DOI: 10.1016/j.clim.2016.05.003.

Saruhan-Direskeneli G, Kiliç A, Parman Y, Serdaroğlu P, Deymeer F. HLA-DQ Polymorphism in Turkish Patients With Myasthenia Gravis. *Hum Immunol.* 2006;67(4–5):352–8. PMID: 16720217. DOI: 10.1016/j.humimm.2006.02.039.

Seldin MF, Alkhairy OK, Lee AT, Lamb JA, Sussman J, Pirskanen-Matell R, et al. Genome-Wide Association Study of Late-Onset Myasthenia Gravis: Confirmation of TNFRSF11A and Identification of ZBTB10 and Three Distinct HLA Associations. *Mol Med.* 2016;21(1):769–81. PMID: 26562150. DOI: 10.2119/molmed.2015.00232.

Shinomiya N, Nomura Y, Segawa M. A variant of childhood-onset myasthenia gravis: HLA typing and clinical characteristics in Japan. *Clin Immunol.* 2004;110(2):154–8. PMID: 15003812. DOI: 10.1016/j.clim.2003.10.004.

Sieb JP. Myasthenia gravis: An update for the clinician. *Clin Exp Immunol.* 2014;175:425–38. PMID: 24117026. DOI: 10.1111/cei.12217.

Simpson JA. Immunological disturbances in myasthenia gravis with a report of Hashimoto's disease developing after thymectomy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1964;27:485–92. PMID: 14249387. DOI: 10.1136/jnnp.27.6.485.

Simpson JA. Myasthenia Gravis: A New Hypothesis. *Scott Med J.* 1960;5(10):419–36. DOI: 10.1177/003693306000501001.

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. PMID: 20402760. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2010.03019.x.

Slowikoswski J, Kubrakiewicz Z, Zielinski S. Giant hypertrophy of the thymus in three siblings. *Pol Med J.* 1968;7:634–7. PMID: 5669703.

Somnier FE, Keiding N, Paulson OB. Epidemiology of Myasthenia Gravis in Denmark a Longitudinal and Comprehensive Population Survey. *Arch Neurol.* 1991;48(7):733-9. PMID: 1859301.

Spurkland A, Gilhus NE, Rønningen KS, Aarli JA, Vartdal F. Myasthenia gravis patients with thymus hyperplasia and myasthenia gravis patients with thymoma display different HLA associations. *Tissue Antigens.* 1991;37(2):90–3. PMID: 2057938.

Sudres M, Verdier J, Truffault F, Le Panse R, Berrih-Aknin S. Pathophysiological mechanisms of autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2018 Feb;1413(1):59-68. PMID: 29377165. DOI: 10.1111/nyas.13560.

Suzuki S, Kuwana M, Yasuoka H, Tanaka K, Fukuuchi Y, Kawakami Y. Heterogeneous immunogenetic background in Japanese adults with myasthenia gravis. *J Neurol Sci.* 2001;189(1–2):59–64. PMID: 11535234.

Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens.* 1994;43(1):18–27. PMID: 8023317.

Szobor A. Familial myasthenia gravis: nine patients in two generations. *Acta Med Hung.* 1991;48(3–4):145–9. PMID: 1822853.

T

Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: From genes to mechanism. *Nature.* 2016;539(7628):197-206. PMID: 27830784. DOI: 10.1038/nature20413.

Testi M, Terracciano C, Guagnano A, Testa G, Marfia GA, Pompeo E, et al. Association of HLA-DQB1*05:02 and DRB1*16 alleles with late-onset, nonthymomatous, AChR-Ab-positive myasthenia gravis. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:541760. PMID: 23091703. DOI: 10.1155/2012/541760.

Thiruppathi M, Rowin J, Li Jiang Q, Sheng JR, Prabhakar BS, Meriggioli MN. Functional defect in regulatory T cells in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1274(1):68–76. PMID: 23252899. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06840.x.

V

Van Rheenen W, Shatunov A, Dekker AM, McLaughlin RL, Diekstra FP, Pulit SL, et al. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet.* 2016;48(9):1043-8. PMID: 27455348. DOI: 10.1038/ng.3622.

Vandiedonck C, Giraud M, Garchon HJ. Genetics of autoimmune myasthenia gravis: The multifaceted contribution of the HLA complex. *J Autoimmun.* 2005;25 Suppl:6-11. PMID: 16260117. DOI: 10.1016/j.jaut.2005.09.010.

Vandiedonck C, Knight JC. The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2009;8(5):379-94. PMID: 19468039. DOI: 10.1093/bfgp/elp010.

Vandiedonck C, Raffoux C, Eymard B, Tranchant C, Dulmet E, Krumeich S, et al. Association of HLA-A in autoimmune myasthenia gravis with thymoma. *J Neuroimmunol.* 2009;210(1):120–3. PMID: 19278738. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2009.02.004.

Vidal S, Morante MP, Moga E, Mosquera AM, Querol S, Garcia J, et al. Molecular analysis of HLA-DRB1 polymorphism in north-east Spain. *Eur J Immunogenet.* 2002;29(1):75–7. PMID: 11841495.

Vidal-Taboada JM, Pugliese M, Salvadó M, Gámez J, Mahy N, Rodríguez MJ. KATP Channel Expression and Genetic Polymorphisms Associated with Progression and Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol.* 2018;55(10):7962-7972. doi: 10.1007/s12035-018-0970-7. PMID: 29492846 .

Vieira M, Caillat-Zucman S, Gajdos P, Cohen-Kaminsky S, Casteur A, Bach J. Identification by genomic typing of non-DR3 HLA class II genes associated with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 1993;47(2):115–22. PMID: 8370765.

Viken MK, Dahlen Sollid H, Joner G, Dahl-Jørgensen K, Rønningen KS, Undlien DE, et al. Polymorphisms in the cathepsin L2 (CTSL2) gene show association with type 1 diabetes and early-onset myasthenia gravis. *Hum Immunol.* 2007;68(9):748–55. PMID: 17869649. DOI: 10.1016/j.humimm.2007.05.009.

Vincent A, Newsom-Davis J. Absence of anti-acetylcholine receptor antibodies in congenital myasthenia gravis. *Lancet.* 1979 Feb 24;1(8113):441-2. PMID: 84290.

Vincent A. Tissue-specific antibodies in myasthenia gravis. *J Clin Pathol.* 1979 Jun 9;s3-13(1):97–106. PMID: 391832. DOI: 10.1136/jcp.s3-13.1.97.

Vincent A, Palace J, Hilton-Jones D. Myasthenia gravis. *Lancet.* 2001;357:2122–8. PMID: 11445126. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)05186-2.

W

Wang J, Bansal AT, Martin M, Germer S, Benayed R, Essioux L, et al. Genome-wide association analysis implicates the involvement of eight loci with response to tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(3):235-41. PMID: 22491018. DOI: 10.1038/tpj.2012.8.

Wilton S. Long-range PCR. *eLS*. 2002. DOI: 10.1038/npg.els.0003767.

Wolfe GI, Herbelin L, Nations SP, Foster B, Bryan WW, Barohn RJ. Myasthenia gravis activities of daily living profile. *Neurology*. 1999;52(7):1487-9. PMID: 10227640. DOI: 10.1212/wnl.52.7.1487.

Wolfe GI, Kaminski HJ, Aban IB, Minisman G, Kuo H-C, Marx A, et al. Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. protocol. *N Engl J Med*. 2016;375(6):511-22. PMID: 27509100. DOI: 10.1056/NEJMoa1602489.

Wright R, Kerr JH. Autoimmunity in myasthenia gravis: a family study. *Clin Exp Immunol*. 1967;2(1):93-101. PMID: 5298404.

Wuketich S, Zwintz E. Familial thymoma. *Wien Klin Wochenschr*. 1983;10(95):424-8. PMID: 6613140.

X

Xie YC, Qu Y, Sun L, Li HF, Zhang H, Shi HJ, et al. Association between HLA-DRB1 and myasthenia gravis in a northern Han Chinese population. *J Clin Neurosci*. 2011;18(11):1524-7. PMID: 21924912. DOI: 10.1016/j.jocn.2011.05.002.

Y

Yamamoto AM, Gajdos P, Eymard B, Tranchant C, Warter JM, Gomez L, et al. Anti-titin antibodies in myasthenia gravis: Tight association with thymoma and heterogeneity of nonthymoma patients. *Arch Neurol*. 2001;58(6):885-90. PMID: 11405802.

Yan M, Xing GL, Xiong WC, Mei L. Agrin and LRP4 antibodies as new biomarkers of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1413(1):126-135. PMID: 29377176. DOI: 10.1111/nyas.13573.

Yang H, Hao J, Peng X, Simard AR, Zhang M, Xie Y, et al. The association of HLA-DQA1*0401 and DQB1*0604 with thymomatous myasthenia gravis in northern Chinese patients. *J Neurol Sci*. 2012;312(1-2):57-61. PMID: 21917268. DOI: 10.1016/j.jns.2011.08.023.

Yousefipour G, Salami Z, Farjadian S. Association of HLA-DQA1 * 0101 / 2 and DQB1 * 0502 with Myasthenia Gravis in Southern Iranian Patients Association of HLA-DQA1 * 0101 / 2 and DQB1 * 0502 with Myasthenia Gravis in Southern Iranian Patients. 2009;6(June):99-102. PMID: 19561379. DOI: IJlv6i2A6.

Z

Zagoriti Z, Kambouris ME, Patrinos GP, Tzartos SJ, Poulas K. Recent Advances in Genetic Predisposition of Myasthenia Gravis. *Biomed Res Int*. 2013; 1-12. PMID: 24294607. DOI: 10.1155/2013/404053

Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, Ragheb S, Bealmear B, Lewis RA, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol*. 2012;69(4):445-51. PMID: 22158716. DOI: 10.1001/archneurol.2011.2393.

Zhu W-H, Lu J-H, Lin J, Xi J-Y, Lu J, Luo S-S, et al. HLA-DQA1*03:02/DQB1*03:03:02 is strongly associated with susceptibility to childhood-onset ocular myasthenia gravis in Southern Han Chinese. *J Neuroimmunol.* 2012;247(1–2):81–5. PMID: 22503410. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.03.018

Živković SA, Clemens PR, Lacomis D. Characteristics of late-onset myasthenia gravis. *J Neurol.* 2012;259(10):167–71. PMID: 22476514. DOI: 10.1007/s00415-0.

ANEXO 1:

Artículo publicado

“Study of the prevalence of familial autoimmune myasthenia gravis in a Spanish cohort”

Study of the Prevalence of Familial Autoimmune Myasthenia Gravis in a Spanish Cohort

Maria Salvado, Merce Canela, Jose Maria Ponseti, Laura Lorenzo, Cecilia Garcia, Sonia Cazorla, Gisela Gili, Nuria Raguer, Josep Gamez*

Myasthenia Gravis Unit. Clinic of Neuromuscular Disorders and Rare Diseases, Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Corresponding author at: Myasthenia Gravis Unit, Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron-U.A.B, Vall d'Hebron Research Institute, Passeig Vall d'Hebron, 119, Barcelona, Spain. E-mail address: josepgamez.bcn@gmail.com

Abbreviations: FAMG = familial autoimmune myasthenia gravis; LO = late onset; VLO = very late onset; CMS = congenital myasthenic syndromes; MGFA = Myasthenia Gravis Foundation of America.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2015.11.049>

ABSTRACT

Background. Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease caused by a failure of neuromuscular transmission. Familial clustering has been reported despite MG usually manifesting as a sporadic condition presumed not to be inherited. Our study investigated the prevalence of FAMG in a Spanish cohort, characterizing their phenotype, antibody titres and thymus findings.

Material/methods. We investigated the presence of familial cases in 462 MG patients, characterizing by age and MGFA class at debut, quantitative MG score, antibody titres, MGFA post-intervention status and thymus pathology.

Results. Sixteen cases from 8 unrelated pedigrees were identified. The prevalence of FAMG cases was 3.46%. Mean age at onset was 57.8 ± 17.4 years (range=23-82). Distribution at debut was: 6 ocular, 4 IIa, 4 IIb, 1 IIIa and 1 IIIb. Thymoma was identified in two of the 7 thymectomised individuals.

Conclusions. The prevalence of FAMG in Spain is similar to other populations. Post-intervention status did not differ from sporadic autoimmune MG. As in other neuromuscular disorders, phenotype and inheritance heterogeneity are present in FAMG. In addition to the interfamilial heterogeneity observed, members of the same family affected with FAMG may even present different ages of onset, severity and thymus involvement. Further studies are necessary to clarify the role of genetic risk factors in this form of autoimmune MG.

Keywords: Myasthenia gravis, Familial autoimmune myasthenia gravis; FAMG, Epidemiology, Genetic, Thymoma, Neuromuscular junction, Clinical heterogeneity, Autoimmunity, Twins, Genetic predisposition, Dominantly inherited myasthenia gravis, -Familial occurrence of autoimmune myasthenia gravis

1. INTRODUCTION

Myasthenia gravis (MG) is a chronic autoimmune disease caused by a failure of neuromuscular transmission. This failure results from the binding of autoantibodies to signalling proteins, mostly the nicotinic acetylcholine receptor (AChR), at the neuromuscular junction [1-4]. Although MG manifests most commonly as a sporadic condition that is presumed not to have been inherited, familial clustering has been described in the literature on very rare occasions. Between 1% and 5% of patients with autoimmune myasthenia gravis (MG) have a positive familial history for the disease (FAMG) [5-9]. The first case of FAMG was reported by Oppenheim in 1898, who described a family in which the sister of a woman who had died from the disease presented features of MG [7,10].

Poor recording of familial autoimmune myasthenia gravis (FAMG) has hindered the delineation of any possible differences between FAMG and sporadic autoimmune MG. One of the reasons for this poor recording of FAMG is perhaps that many familial MG pedigrees, particularly those reported before the 1970s, might in fact have been families with congenital myasthenic syndromes (CMS) [5]. However, even though the FAMG phenotype has not been entirely defined, some authors suggest that FAMG differs from sporadic autoimmune MG in some aspects; consisting of an earlier onset, especially in men, a slower and more benign progression, with fewer clinical fluctuations and lower morbidity and mortality rates [5,11-14].

The prevalence of FAMG has not been studied in Spain to date. We investigated the prevalence and clinical, serological, and pathological characterization of FAMG in a series of 462 MG patients monitored in our multidisciplinary Myasthenia Gravis Unit from 2000 to 2014.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study population

This study included all the patients with autoimmune MG monitored at the Myasthenia Unit in the Neurology Department of Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona between 1 January 2000 and 31 December 2014. The population was entirely of Caucasian descent.

The diagnosis of MG was established based on history, signs and symptoms, electromyography (EMG) (single fibre and repetitive nerve stimulation), edrophonium test, and serum anti-AChR antibodies. In anti-AChR antibody-negative patients, the diagnosis was made by clinical findings, EMG, and edrophonium test. The presence of anti-MuSK antibodies was studied in all seronegative patients.

The patients were stratified in subgroups according to the age at disease onset. Patients with MG onset before the age of 40 were considered early-onset forms (EOMG) [15]. Patients reporting first symptoms after 40 years old were classified as late-onset forms (LOMG) and very late-onset forms included patients with onset after the age of 65.

Although there is currently no consensus on the definition of familial autoimmune

Myasthenia Gravis (FAMG), we assumed that those pedigrees with at least two affected members with autoimmune MG among the blood relatives for the three generations of ancestors and two generations of descendants should be considered as FAMG.

The patients provided written informed consent in accordance with a protocol approved by our institution's Clinical Research Ethics Committee, and following the Declaration of Helsinki.

2.2. Study variables

The study variables included demographic data (age, age at onset, gender and geographical origin), onset MGFA classification, the highest QMG value, post-interventional status, thymectomy, thymus histopathology, anti-AChR and anti-MuSK antibodies titres, and concomitant autoimmune diseases affecting the patient or any of their first-degree relatives [16].

The inheritance pattern in each family was also analysed, focusing on the gender of the transmitting parent for dominant forms, the existence of consanguinity for the recessive ones, as well as inter- and intrafamilial heterogeneity.

2.3. Statistical analysis

The analysis was performed with SPSS 17.0 software (SPSS Inc.), using descriptive analysis tools and frequency tables. The demographic data are expressed in terms of the median, range and standard deviation for quantitative variables. The results for categorical variables are expressed as both absolute values and percentages.

3. RESULTS

Among the 462 patients monitored for MG, we found 8 unrelated pedigrees, comprising 16 MG patients and two asymptomatic individuals through 1 or 2 generations. The patients' and relatives' demographics and clinical characteristics are summarized in the table. The FAMG population was entirely of Caucasian descent.

Sex distribution included 11 (68.8%) women and 5 (31.3%) men with a mean age at onset of 59.44 ± 29.35 (range 23-82) and a mean follow-up time of 10.69 ± 10.2 years.

LOMG and VLOMG (81.2%) were the most commonly observed phenotypes in our series, compared to EOMG (18.8%). Debut MGFA class distribution was as follows: six ocular forms (37.5%), four IIa forms (25.0%), four IIb (25.0%), one IIIa (6.25%), and one IIIb (6.25%).

Thirteen out of 16 patients were found to have positive antibodies against the AChR (81.2%), and it was negative in 2 patients (12.5%). Fourteen out of 16 patients were also tested for MuSK antibodies, but none were positive.

Seven patients underwent thymectomy. The pathological study was consistent with thymoma in two cases (28.6%) and with hyperplasia in five (71.4%). The chest imaging results in case 17 were highly suggestive of thymoma, but the patient's

compromised respiratory status discommended surgery.

Other autoimmune diseases were found in 9 individuals from six unrelated families. Hypothyroidism was present in three patients. One patient had previously been diagnosed with Sjögrens' syndrome, two individuals had diabetes, one had psoriasis, another had vitiligo and the last one suffered from celiac disease.

One patient was stable without any pharmacological treatment. Fifteen out of 16 (93.7%) were taking oral pyridostigmine; seven (43.8%) were on prednisone (PR) and seven (43.8%) required a second line immunosuppressant. Of the latter group, one patient was taking prednisone and add-on Mycophenolate mofetil (MM), and six patients (37.5%) were treated with a combination of tacrolimus and another immunosuppressant: PR (n=3), azathioprine (AZA; n=1), PR and AZA (n=1) and MM (n=1).

In terms of their post-interventional status, eleven of the 16 patients (68.8%) were classified as having minimal manifestations (MM) of the disease, one of them improved (6.3%; remitting case), one was on CSR and two patients (12.5%) worsened. Only one refractory myasthenic patient (6.3%) required admission to the intensive care unit, and died after an opportunistic infection in the context of chronic immunosuppressant drugs for MG (family 6, case 13).

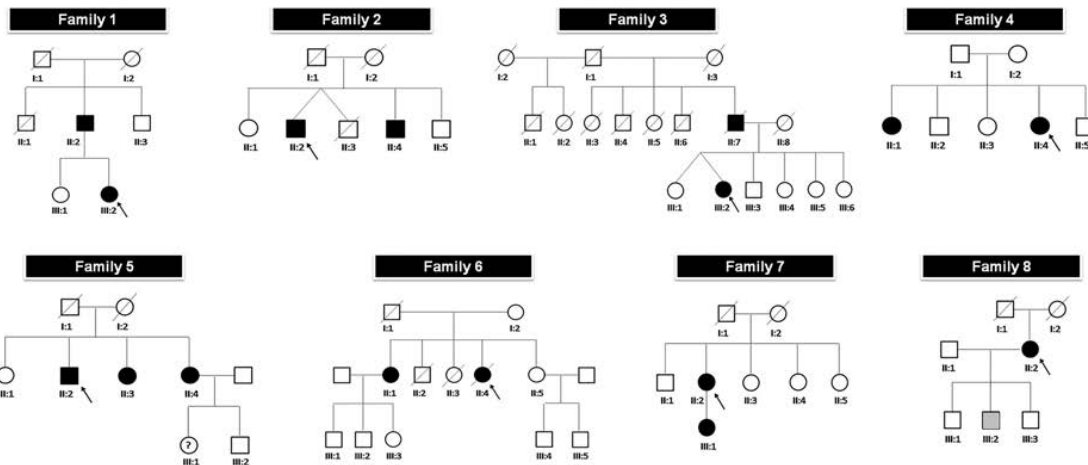


Fig.1 Pedigrees of the families studied. The proband is indicated by an arrow in each kindred. Male family members are represented by squares, females by circles, deceased members by diagonals and affected by solid symbols.

4. DISCUSSION

We report here on the results of a study of prevalence and clinical, serological and pathological characterization in a Spanish MG population. In our series of 462 patients with autoimmune myasthenia, we identified 16 familial cases, belonging to 8 unrelated families. The prevalence of FAMG in our series is 3.46%, consistent with the occurrence found in other series [5,7,9,14,17]. Higher frequencies have been reported in Scandinavian countries, where recording criteria have traditionally been more thorough [18].

We reviewed PubMed in search of FAMG cases and series where the determination of AChR, MuSK or both antibodies was specifically mentioned. We found nearly 20 ethnically diverse families worldwide, containing more than 50 patients aged between 12 and 85 years old. Despite familial forms of myasthenia having classically been considered as having an earlier onset, we observed a clear predominance of late and very late onset in our series. These results are not entirely surprising, given that several authors have recognized a significant increase in later onset patients in sporadic forms of MG in recent decades [19,20]. Another clinical characteristic hindering the identification of other affected members in a patient's family is that FAMG individuals often present with a slower and more benign progression.

Late onset and clinical inter- and intrafamilial heterogeneity were two common features in our families. We observed a remarkable degree of intrafamilial heterogeneity in clinical onset in the affected members of three of our families (kindreds 1, 5 and 7). A common clinical characteristic in the other five was late or very late onset (kindreds 2, 3, 5, 6 and 8). Affected members may present with early and late onset and ocular and generalized MGFA class, and different post-intervention statuses in the same family. In other words, there is no standard distinctive clinical phenotype for FAMG. HLA alleles, concisely DRB1*15:01 haplotype, have been proposed as major risk alleles in Caucasian LOMG [21]. Preliminary studies of high resolution HLA DR alleles found no association of LOMG with this haplotype in our families [22].

The most striking example is found in family 6, in which two affected sisters (II:2 and II:3) showed different disease severity in terms of MGFA class at onset and progression. The elder had MG class I at onset (69 years) (II:4), generalizing at age 71 and showing a good response to pyridostigmine and low doses of prednisone. Her younger sister (II:1) had class IIIb at onset, with poor response to various immunosuppressant drugs including rituximab, complicating with several myasthenic crisis and ICU admissions. Both were AChRAb positive.

This FAMG variability has also been described in the most indicative MG families - the three-generation British pedigree reported in 1982 [23], the Hungarian family reported in 1991 [24], the Italian families compiled in 1998 [17], the large Canadian pedigree studied in 2000 [7] and the Chinese and Iranian families discussed in 2012 [8], which explicitly reflect this characteristic inter- and intrafamilial phenotypic variability according to MG onset and severity.

More than half of our patients had antibodies for AChR. Nevertheless, a few individuals had negative or borderline values for AChR antibodies. In the latter, neurophysiology studies and the edrophonium test helped us to confirm the affected member's condition. A comprehensive study of families 1, 5 and 7 enabled us to identify individuals belonging to the same family but with a different serological status (Table 1). Some authors had previously emphasized that phenotypic variability not merely affected clinical aspects, but could also differentiate individuals by their serological results and by the presence or absence of thymus disorders [7,17,25-27]. In a Serbian family, the mother was AChR seropositive, while her daughter showed MuSK antibodies and was AChR seronegative [27]. More recently, in a Chinese family, the authors described the presence of AChR antibodies in the mother and the daughter, but the son had a double

seronegative myasthenia [8].

Concomitant autoimmune disorders were found in 9 individuals from six different families in our series. This is a characteristic association among sporadic forms [7,17,18,23,28-30].

Pathological findings in thymectomized patients showed thymoma in two of them and hyperplasia in five. The frequencies observed in our families were similar to those in other series [25,31-33]. Familial aggregation was first described in 1968 [31-33]. Recently, the coincidence of thymoma and myasthenia in the same family was related to a balanced translocation t(14;20) found in some individuals belonging to two unrelated pedigrees [34,35].

In terms of clinical-genetic characterization, the inheritance pattern distribution in our series enabled us to identify autosomal recessive and dominant transmission in some pedigrees. Both patterns have previously been observed in the literature [24, 36]. No X-linked forms have been described. A possible anticipation phenomenon was reported in many families with a dominant pattern [24]. This author also noted that the severity of the disease increased with each generation. Offspring presented earlier onset than their affected parents in two families in our series (kindreds 1 and 7 Figure 1).

Sister-sister and brother-sister pairs were the most frequent relationships seen in our series, followed by families with a suggestive autosomal dominant inheritance pattern (e.g. father-daughter). FAMG can affect almost any relative in a family [5,7]. Interestingly, in one of our families (family 3), one of the dizygotic twin sisters developed myasthenia gravis, with their father also being affected.

In short, FAMG is probably more frequent than it has traditionally been believed. Both AChR and MuSK antibodies could help us to better characterize these patients, and to avoid the inclusion of congenital cases in future series. Neurologists interested in myasthenia gravis should remember to ask their myasthenic patients about whether they have any other possible affected relatives, in order to better identify this particular subgroup of patients, and particularly about family members with fatigability complaints and/or ocular symptoms, who could be negative for both anti-AChR and anti-MuSK antibodies. The FAMG phenotype is ordinarily indistinguishable from the sporadic autoimmune forms of MG, and its treatment and management should consequently be the same in both scenarios. Many diverse gene factors might be implicated in FAMG occurrence and development. The recent results of a GWAs performed in an AChR antibody-positive MG cohort suggests that heritability associated with MG is probably significantly higher than the rate of familial disease, and similar to that observed in other neurological disorders such as ALS and/or Parkinson disease [37]. Worldwide population genetic studies are needed in order to identify the risk factors, susceptibility or phenotype modifying genes related to both sporadic and familial autoimmune MG. Furthermore, targeting the genetic or epigenetic factors which may act as phenotype expression modifiers will provide a better understanding of intra-familial variability [38,39].

Acknowledgements

The authors are indebted to the patients and their relatives for their cooperation. JG is the recipient of a grant from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI10-01070 and FIS PI13-01272-FEDER), and an Interlaken Research Awards Program (2012-12094537).

References

1. Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ (2006) Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 116:2843–54.
2. Jayawant S, Parr J, Vincent A (2013) Autoimmune myasthenia gravis. *Handb Clin Neurol* 113:1465-8.
3. Berrih-Aknin S, Le Panse R (2014) Myasthenia gravis: a comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *J Autoimmun* 52:90-100.
4. Sieb JP (2014) Myasthenia gravis: an update for the clinician. *Clin Exp Immunol* 175(3):408-18.
5. Namba T, Brunner NG, Brown S (1971) Familial myasthenia gravis. Report of 27 patients in 12 families and review of 164 patients in 73 families. *Arch Neurol* 25(1):49-60.
6. Jimenez Lopez A, Fuertes Martin A, Olmos Martinez JM, Hernandez Navarro F, de Castro del Pozo S (1984) [Myasthenia gravis in 3 siblings of a gypsy family]. *Med Clin (Barc)* 14;82(1):25-7.
7. Marrie RA, Sahlas DJ, Bray GM (2000) Familial autoimmune myasthenia gravis: four patients involving three generations. *Can J Neurol Sci* 27(4):307-10.
8. Chen Y, Wang W, Wei D, et al (2012) Three cases of myasthenia gravis from one family with variations in clinical features and serum antibodies. *Neuromuscul Disord* 22(3):286-8.
9. Landouere G, Knight MA, Stanescu H, et al (2012) A candidate gene for autoimmune myasthenia gravis. *Neurology* 79(4):342-7.
10. Oppenheim H (1904) Diseases of the nervous system; a text-book for students and practitioners of medicine. 2nd edn. Edward E. Mayer, trans, Philadelphia and London, J.B. Lippincott company, p 692.
11. Goulon M, Tournilhac M, Lorin MC, et al (1960) Familial myasthenia (apropos of 2 sisters with myasthenia). *Rev Neurol (Paris)* 103:109-17.
12. Boudouresques J, Khalil R, Gosset A, et al (1975) Familial myasthenia. Observations in a father and his daughter. *Nouv Presse Med* 4(37):2655-6.
13. Abbruzzese M, Agnoli A, Pastorino P, et al (1974) Familial cases of myasthenia. *Riv Neurobiol* 20(14):40-51.
14. Pascuzzi RM, Sermas A, Phillips LH, 2nd, et al (1986) Familial autoimmune myasthenia gravis and thymoma: occurrence in two brothers. *Neurology* 36(3):423-7.
15. Meriggioli MN, Sanders DB (2009) Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol* 8(5):475-90.
16. Jaretzki A 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, et al (2000) Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology* 55(1):16-23.
17. Evoli A, Batocchi AP, Zelano G, et al (1995) Familial autoimmune myasthenia gravis: report of four families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58(6):729-31.
18. Pirskanen R. Genetic aspects in myasthenia gravis (1977) A family study of 264 Finnish patients. *Acta Neurol Scand* 56(5):365-88.
19. Lanford JW, Phillips LH (2009) Epidemiology and Genetics of Myasthenia Gravis. In *Myasthenia Gravis and related disorders*. 2nd edition Ed H.J. Kaminski. Humana press Springer Science. New York 71-78.
20. Alkhawajah NM, Oger J (2013) Late-onset myasthenia gravis: a review when incidence in older adults keeps increasing. *Muscle Nerve* 48(5):705-10.
21. Maniaol AH, Elsaï A, Lorentzen ÅR, Owe JF, Viken MK, Sæther H et al (2012) Late onset myasthenia gravis is associated with HLA DRB1*15:01 in the Norwegian population. *PLoS One* 7(5):e36603. doi: 10.1371/journal.pone.0036603.
22. Gamez J, Ponseti Bosch JM, Herrero Mata MJ, Salvadó-Figueras M, Palou Rivera E, Canela Cardona M (2012) Investigation of HLA-DRB1 as a risk allele for familial autoimmune myasthenia

- gravis reported in six Spanish families. 12th International Conference on Myasthenia Gravis and Related Disorders. NY Acad Sci. MGFA. Abstract booklet, page 33-34. <http://www.nyas.org/asset.axd?id=d7ffa8b0-013c-47b3-b914-724da00caa8f&t=634727731871800000>. Last accessed Aug 6th, 2015.
23. Honeybourne D, Dyer PA, Mohr PD (1982) Familial myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 45(9):854-6.
 24. Szobor A (1991) Familial myasthenia gravis: nine patients in two generations. *Acta Med Hung* 48(3-4):145-9.
 25. Rotstein DL, Bril V (2012) A family with myasthenia gravis with and without thymoma. *Can J Neurol Sci* 39(4):539-40.
 26. Provenzano C, Arancio O, Evoli A, et al (1988) Familial autoimmune myasthenia gravis with different pathogenetic antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51(9):1228-30.
 27. Lavrnjic D, Nikolic A, De Baets M, et al (2008) Familial occurrence of autoimmune myasthenia gravis with different antibody specificity. *Neurology* 70(21):2011-3.
 28. Simpson JA (1964) Immunological disturbances in myasthenia gravis with a report of Hashimoto's disease developing after thymectomy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 27:485-92.
 29. Wright R, Kerr JH (1967) Autoimmunity in myasthenia gravis: a family study. *Clin Exp Immunol* 2(1):93-101.
 30. Nacu A, Andersen JB, Lisnic V, et al (2015). Complicating autoimmune diseases in myasthenia gravis: a review. *Autoimmunity* 27:1-7 [Epub ahead of print].
 31. Slowikowski J, Kubrakiewicz Z, Zielinski S (1968) Giant hypertrophy of the thymus in three siblings. *Pol Med J* 7(3):634-7.
 32. Matani A, Dritsas C (1973) Familial occurrence of thymoma. *Arch Pathol* 95(2):90-1.
 33. Wuketich S, Zwintz E (1983) [Familial thymoma]. *Wien Klin Wochenschr* 10;95(12):424-8.
 34. Deminatti MM, Ribet M, Gosselin B, et al (1994) Familial thymoma and translocation t(14;20)(q24;p13). *Ann Genet* 37(2):72-4.
 35. Nicodeme F, Geffroy S, Conti M, et al (2005) Familial occurrence of thymoma and autoimmune diseases with the constitutional translocation t(14;20)(q24.1;p12.3). *Genes Chromosomes Cancer* 44(2):154-60.
 36. Bergoffen J, Zmijewski CM, Fischbeck KH (1994) Familial autoimmune myasthenia gravis. *Neurology* 44(3 Pt 1):551-4.
 37. Renton AE, Pliner HA, Provenzano C, Evoli A, Ricciardi R, Nalls MA, et al. A genome-wide association study of myasthenia gravis. *JAMA Neurol.* 2015;72(4):396–404.
 38. Zagoriti Z, Kambouris ME, Patrinos GP, et al (2013) Recent advances in genetic predisposition of myasthenia gravis. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2013/404053.
 39. Avidan N, Le Panse R, Berrih-Aknin S, et al (2014) Genetic basis of myasthenia gravis - a comprehensive review. *J Autoimmun* 52:146-53.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de las formas familiares de miastenia gravis autoinmune

Familia	Caso	Relación	Sexo	Edad al debut (años)	Edad en la última visita (años) y estado actual	Clasificación por edad debut	MGFA debut	Duración (años)	QMG más alto	Timectomia	Histología	ACHR-Ab	MuSK-Ab	Otras enfermedades autoinmunes
1	1	Padre	H	81	88 SIMP	VLOMG	I	7	ND	NO	ND	N	N	NO
	2	Hija	M	50	54 SIMP	LOMG	I	4	5	NO	ND	P	N	Celaquia
2	3	Herrmano	H	67	79 SIMP	VLOMG	I	12	5	NO	ND	P	N	Vitiligo
	4	Herrmano	H	69	73 SIMP	VLOMG	I	4	ND	NO	ND	P	N	NO
3	5	Padre	H	62	80 EX ^(b)	LOMG	IIb	18	ND	NO	ND	ND	ND	NO
	6	Hermana (gemelas)	M	59	67 SIMP	LOMG	IIb	8	4	NO	ND	P	N	NO
	7	Hermana (gemelas)	M	ND	67 ASIMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	N	NO
4	8	Hermana	M	33	40 SIMP	EOMG	IIa	7	5	SI	Hi	P	N	Hipotiroidismo
	9	Hermana	M	31	36 SIMP	EOMG	IIa	5	10	SI	Hi	P	N	Diabetes Mellitus tipo 2
5	10	Hermana	M	58	87 SIMP	LOMG	IIa	29	14	SI	Hi	P	N	Hipotiroidismo
	11	Herrmano	H	50	89 SIMP	LOMG	IIa	39	5	SI	T	P	N	NO
6	12	Hermana	M	77	81 SIMP	VLOMG	I	4	10	NO	ND	N	N	Hipotiroidismo
	13	Hermana	M	54	64 EX ^(a)	LOMG	IIb	10	21	SI	T	P	N	Diabetes Mellitus tipo 2
7	14	Hermana	M	69	75 SIMP	VLOMG	I	6	18	SI	Hi	P	N	Síndrome de Sjögren
	15	Madre	M	59	63 SIMP	LOMG	IIa	4	16	NO	ND	N	N	NO
8	16	Hija	M	23	36 SIMP	EOMG	IIb	13	14	SI	Hi	P	N	NO
	17	Madre	M	82	83 SIMP	VLOMG	IIb	1	8	NO	ND	P	ND	NO
	18	Hijo ^(c)	H	ND	61 ASIMP	ND	ND	ND	ND	NO	ND	P	N	Psoriasis

Abreviaturas: ASIMP=asintomático; EOMG= miastenia debut precoz o early onset myasthenia gravis; EX=éxito; H=hombre; Hi=hiperplasia; LOMG= miastenia debut tardío o late onset myasthenia gravis; M=mujer; N=negativo; ND=no disponible; P=positivo; QMG= puntuación máxima en el quantitative myasthenia gravis test; SIMP=sintomático; T=ítmoma; VLOMG= miastenia de debut muy tardío o very late onset myasthenia gravis. §=éxito por insuficiencia respiratoria a la edad de 80 años; ¶=éxito debido al empeoramiento del estado de la miastenia e infección oportunistas a los 64 años; φ=paciente con diagnóstico radiológico de timoma, pero sin síntomas clínicos de MG.

ANEXO 2:

Resultados del estudio “Estudio de alelos y haplotipos HLA en una población española de miastenia gravis autoinmune esporádica”

Los resultados del estudio “**Estudio de los alelos y haplotipos HLA en una población española de miastenia gravis autoinmune esporádica**” descritos en este Anexo 2 comprenden aquellos resultados no detallados en el anterior apartado 4.3.

Estos datos del análisis corresponden a los realizados antes de excluir a los individuos no caucásicos. Comprenden 246 casos de MG esporádica o SAMG (de los cuales 234 son individuos de origen caucásico, 12 pacientes son de etnia no caucásica) y 492 individuos control.

Análisis caso-control

Tabla A1. Comparación interna del grupo control según el género.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de protección (OR<1)						
A*	30:01:00	3,85	1,06-20,99	0,024	*	no
A*	33:01:00	2,36	0,95-6,67	0,05	no	no
DQB1*	06:02	1,69	1,02-2,84	0,032	*	no

El grupo casos está formado por los individuos control mujeres y el grupo control, por los hombres control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los alelos ni haplotipos HLA entre mujeres y hombres dentro del grupo control. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A2. Comparación de casos MG y controles según el género (hombres).

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de protección (OR<1)						
DQB1*	03:01	0,58	0,35-0,93	0,002	*	no

Haplotipo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)					
A*29:02-B*44:03-C*16:01-DRB1*07:01-DQB1*02:02	1,06	0,43-2,44		no	no
				0,89	
Factores de protección (OR<1)					
A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-binned	0,95	0,41-2,33		0,89	no

El grupo casos está formado por los casos hombres MG (n=110) y el grupo control por los hombres control (n=220). No se observaron diferencias estadísticamente significativas, aunque el alelo HLA- DQB1*03:01 mostraba una tendencia a la significación estadística, que no se mantuvo tras aplicar la MTc. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A3. Comparación de los casos MG y controles por grupos de edades.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
A*	01:01	1,74	1,06-2,76	0,015	*	no
A*	binned	1,73	1,11-2,66	0,009	*	*
B*	51:01:00	1,82	0,98-3,21	0,030	*	no
C*	06:02	1,02	1,85-1,02	0,023	*	no
Factores de protección (OR<1)						
B*	35:01:00	0,21	0,02-0,79	0,016	*	no
B*	44:03:00	0,45	0,19-0,94	0,029	*	no
C*	04:01	0,53	0,27-0,96	0,030	*	no
C*	16:01	0,41	0,13-1,01	0,047	no	no

El grupo casos está formado por los casos MG y los controles con edad menor o igual a 39 años. El grupo control está formado por los casos MG y los controles mayores de 39 años de edad. No se observan diferencias estadísticamente significativas. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Análisis por grupos fenotípicos de MG

- Según la edad de debut de la MG:

Tabla A4. Comparación de los casos MG de debut tardío (LO) o muy tardío (VLO) según su género.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
C*	06:02	4,29	1,42-17,36	0,005	*	*

El grupo casos está formado por los casos hombres MG de debut tardío o muy tardío (n=96) y el grupo control por los casos mujeres de debut tardío o muy tardío (n=62). El alelo HLA-C*06:02 actúa como posible factor de riesgo para el debut tardío y muy tardío en hombres con MG. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

- Según la forma de presentación y la clasificación funcional MGFA:

Tabla A5. Comparación de los casos MG con debut ocular (MGFA I) contra el resto de MG (MGFA II-V).

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
B*	18:01	1,98	0,96-4,03	0,039	no	no
DQB1*	05:01	1,71	0,96-2,99	0,047	no	no
Factores de protección (OR<1)						
B*	08:01	0,48	0,23-0,94	0,023	*	no
DQB1*	05:03	0,18	0,02-0,74	0,009	*	*

El grupo casos está formado por los casos de MG con debut ocular (MGFA I) (n=83) y el grupo control por el resto de casos de MG de debut no ocular (MGFA II-V) (n=163). No se detectaron alelos o haplotipos HLA que actuaran como posibles factores de riesgo para el debut ocular, pero el alelo DQB1*05:03 actuaba como posible factor de protección para este fenotipo. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc)

- Según el fenotipo anatomopatológico del timo:

Tabla A6. Comparación de los casos de MG+timoma contra el resto de casos de MG timectomizados.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
B*	binned	2,91	1,13-8,87	0,018	*	no
C*	04:01	2,66	1,07-6,53	0,016	*	no
DQB1*	05:01	3,11	1,12-8,65	0,011	*	no
Factores de protección (OR<1)						
B*	08:01	0,34	0,11-0,89	0,018	*	no

El grupo casos está formado por los casos de MG con timoma (n=32) y el grupo control por el resto de casos de MG (timectomizados, con cualquier resultado anatomopatológico, n=80). No se observan diferencias estadísticamente significativas. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A7. Comparación de los casos de MG+hiperplasia tímica contra los casos MG timectomizados y resultados de anatomía patológica del timo normal o atrofia.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
DQB1*	03:01	5,51	1,21-50,71	0,015	*	no
Factores de protección (OR<1)						
A*	binned	0,45	0,18-1,06	0,047	no	no
DQB1*	binned	0,26	0,09-0,66	0,002	*	no

El grupo casos está formado por los casos de MG con hiperplasia tímica (n=44) y el grupo control por los casos de MG timectomizados, con atrofia tímica o timo normal (n=21). No se observan diferencias estadísticamente significativas. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A8. Comparación de los casos de MG+ timoma contra los casos de MG+hiperplasia tímica.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
A*	03:01	3,44	0,9-15,9	0,038	*	no
B*	44:03:00	4,64	1,08-27,51	0,016	*	no
C*	04:01	3,48	1,14-11,81	0,013	*	no
DQB1*	05:01	3,45	1,02-13,27	0,022	*	no
Factores de protección (OR<1)						
B*	08:01	0,33	0,1-0,93	0,021	*	no
DRB1*	03:01	0,4	0,15-1,03	0,039	no	no
DQB1*	02:01	0,4	0,15-1,03	0,039	no	no
DQB1*	03:01	0,38	0,12-1,07	0,045	no	no

Haplotipo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)					
A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0,38	0,09-1,34	0,100	no	no
Factores de protección (OR<1)					
A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-binned	2,6	0,75-11,45	0,100	no	no

El grupo casos está formado por los casos de MG con timoma (n=32) y el grupo control por los casos de hiperplasia tímica (n=44). No se observan diferencias estadísticamente significativas. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A9. Comparación de los casos de MG+hiperplasia tímica contra el resto de casos MG timectomizados.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
B*	08:01	2,71	1,15-6,62	0,012	*	no
DRB1*	03:01	2,33	1,05-5,26	0,022	*	no
DQB1*	02:01	2,33	1,05-5,26	0,022	*	no
DQB1*	03:01	3,37	1,31-9,38	0,005	*	*
Factores de protección (OR<1)						
A*	03:01	0,29	0,07-0,96	0,025	*	no
B*	44:03:00	0,28	0,05-1,08	0,040	*	no
C*	04:01	0,36	0,11-1	0,032	no	no
C*	07:02	0,22	0,02-1,1	0,039	no	no
DQB1*	05:03	0,28	0,05-1,08	0,039	no	no

Haplotipo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)					
A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	3,5	1,1-13,02	0,016	*	no
Factores de protección (OR<1)					
A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-binned	0,29	0,08-0,91	0,016	*	no

El grupo casos está formado por los casos de MG con hiperplasia tímica (n=44) y el grupo control incluye los casos de MG con timoma y los de MG timectomizados con anatomía patológica del timo normal o atrofia (n=53). El alelo DBQ1*03:01 actúa como un posible factor de riesgo para hiperplasia tímica en nuestra cohorte de MG, si lo comparamos con el total de pacientes timectomizados y con resultado de anatomía patológica conocida. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

- **Análisis de variables fenotípicas combinadas: según la edad de debut de la MG y el fenotipo anatomopatológico del timo**

Tabla A10. Comparación de los casos de MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el resto de casos de EOMG.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
A*	02:01	4,47	1,71-12,56	0,0005	*	*
DQB1*	03:01	2,71	1,1-6,88	0,016	*	no

El grupo casos está formado por los casos de MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica (n=35) y el grupo control por el resto de casos de EOMG (n=52). El alelo A*02:01 actúa como un posible factor de riesgo para la MG de debut temprano en nuestra cohorte y el alelo DQB1*03:01 mostraba una tendencia a la significación estadística, que no se mantuvo después de aplicar el MTc. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A11. Comparación de los casos de mujeres MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el resto de casos de EOMG.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
A*	02:01	2,87	1,16-7,13	0,010	*	*
DQB1*	03:01	2,64	1,08-6,44	0,016	*	no
Factores de protección (OR<1)						
C*04:01	04:01	0,22	0,02-0,97	0,030	*	no
DQB1*	binned	0,45	0,23-0,9	0,014	*	no

El grupo casos está formado por los casos de mujeres con MG de debut temprano (EOMG) e hiperplasia tímica (n=29) y el grupo control por el resto de casos de EOMG (n=60). El alelo A*02:01 actúa como un posible factor de riesgo para la MG de debut temprano en mujeres con hiperplasia tímica en nuestra cohorte y el alelo DQB1*03:01 mostraba una tendencia a la significación estadística, que no se mantuvo después de aplicar el MTc. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A12. Comparación de los casos de mujeres MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el resto de casos de mujeres EOMG.

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
A*	02:01	3,58	1,29-10,46	0,005	*	*
DQB1*	03:01	2,79	1,06-7,54	0,019	*	no
Factores de protección (OR<1)						
C*04:01	04:01	0,23	0,02-1,11	0,045	no	no

El grupo casos está formado por los casos de mujeres con MG de debut temprano (EOMG) e hiperplasia tímica (n=29) y el grupo control por el resto de casos de mujeres EOMG (n=45). El alelo A*02:01 actúa como un posible factor de riesgo para la MG de debut temprano en mujeres con hiperplasia tímica en nuestra cohorte y el alelo DQB1*03:01 mostraba una tendencia a la significación estadística, que no se mantuvo después de aplicar el MTc. Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A13. Comparación de los casos de mujeres MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el resto de casos de mujeres MG (excepto EOMG y/o hiperplasia tímica).

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
B*	08:01	5,93	2,1-18,11	0,76	no	no
C*	07:01	2,84	1,25-6,45	0,005	*	*
DRB1*	03:01	3,57	1,48-8,66	0,001	*	*
DQB1*	02:01	3,57	1,48-8,66	0,001	*	*
Factores de protección (OR<1)						
C*	04:01	0,23	0,02-1,11	0,045	no	no

El grupo casos está formado por los casos de mujeres con MG de debut temprano (EOMG) e hiperplasia tímica (n=29) y el grupo control por el resto de casos de mujeres, excepto EOMG y/o con hiperplasia tímica (n=58). Los alelos C*07:01, DRB1*03:01 y DQB1*02:01 actúan como posibles factores de riesgo para la MG de debut temprano en mujeres con hiperplasia tímica en nuestra cohorte cuando las comparamos con el resto de mujeres MG (excepto las que tengan debut temprano y/o hiperplasia tímica). Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

Tabla A14. Comparación de los casos de mujeres MG de debut temprano (EOMG) con hiperplasia tímica contra el subgrupo de casos totales de MG de debut tardío y muy tardío (LO+VLONG).

Locus	Alelo	OR	IC95%	p-valor	sig.	sig. post MTc
Factores de riesgo (OR>1)						
B*	08:01	4,85	2,19-10,44	0,033	*	no
C*	07:01	2,86	1,43-5,58	0,0008	*	*
DRB1*	03:01	3,1	1,52-6,17	0,0004	*	*
DQB1*	02:01	3,1	1,52-6,17	0,0004	*	*
DQB1*	03:01	2,48	1,16-5,06	0,0071	*	*
Factores de protección (OR<1)						
B*	44:03:00	0,16	0-0,98	0,038	*	no
C*	04:01	0,2	0,02-0,82	0,018	*	no
C*	07:02	0,14	0-0,85	0,023	*	no
DRB1*	07:01	0,33	0,08-0,95	0,031	*	no
DQB1*	05:01	0,3	0,06-0,98	0,037	*	no

El grupo casos está formado por los casos de mujeres con MG de debut temprano (EOMG) e hiperplasia tímica (n=29) y el grupo control por el subgrupo de casos totales de MG de debut tardío y muy tardío (LO+VLONG) (n=158). Los alelos C*07:01, DRB1*03:01, DQB1*02:01 y DQB1*03:01 actúan como posibles factores de riesgo para la MG de debut temprano en mujeres con hiperplasia tímica en nuestra cohorte cuando las comparamos con las formas de debut tardío y muy tardío de MG (LONMG y VLONG). Abreviaturas: sig.: significativo estadísticamente; sig. post MTc: significativo después de aplicar la corrección por tests múltiples (MTc).

