

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús estableties per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

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:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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

TESIS DOCTORAL

DETECCIÓN DE MARCADORES CLÍNICOS E INMUNOLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN MIASTENIA GRAVIS

Tesis presentada para optar al grado de Doctor

Doctorando:

Rodrigo Álvarez Velasco

Director:

Dr. Eduard Gallardo Vigo

Tutor:

Dr. Luis Antonio Querol Gutiérrez

A mi padre.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral recoge el trabajo desarrollado durante cuatro años en la Unidad de Patología Neuromuscular del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, donde tuve el privilegio de poder formarme y trabajar rodeado de expertos en neuromuscular, además de buenos compañeros y amigos. Me gustaría agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quería agradecerle a Isabel la confianza que depositó en mí permitiéndome trabajar en su equipo. Me siento muy afortunado de haber podido aprender de ella y no imagino una persona con la que haberlo hecho mejor. Le doy las gracias en nombre de todos los que nos formamos con ella y de la comunidad de profesionales que nos dedicamos a la patología Neuromuscular en la que su inmenso legado permanecerá imborrable.

Gracias a Eduard por su guía experta y su compromiso con el desarrollo de este proyecto. Su dedicación y proximidad hicieron de esta investigación una experiencia enriquecedora y agradable en todo momento.

Gracias a Montse por su confianza desde los primeros días en los que decidí iniciar mi formación en el campo de las enfermedades Neuromusculares. Sus conocimientos, su metodología de trabajo y sus valores me han ayudado a ser mejor médico y me sirven de modelo a seguir.

Gracias a Elena, Luis, Janina, Jordi y Ricard por transmitirme su conocimiento y su pasión por las enfermedades neuromusculares.

Gracias a Fina por enseñarme todas las técnicas de laboratorio y la metodología científica sin las cuales no hubiera podido llevar a cabo esta tesis.

Gracias a Sonia por su ayuda con las bases de datos y por su paciencia.

Gracias a Xavi, Jorge, Cinta, Lorena, Elba, David, Ana, Esther y Marta por su ayuda en el laboratorio y la clínica y por todos los buenos momentos tanto dentro como fuera del Hospital.

Gracias a los pacientes a los cuales van dirigidos todos nuestros esfuerzos y que han hecho posible llevar a cabo esta investigación.

Finalmente, gracias a mis padres Pilar y Juan y a mi hermano Jaime por compartir esta experiencia conmigo y ser fuente de aliento y motivación. Gracias a Clara al lado de la cual

todo es fácil y divertido, gracias a ella he podido seguir adelante con este proyecto incluso en los momentos complicados.

ABREVIACIONES

ACh: acetilcolina

AIRE: autoimmune regulator

BCL6: B-cell lymphoma 6

CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4

FOXP3: forkhead box P3

GWAS: Genome-wide association study

Ig: Inmunoglobulina

i.v.: intravenosos

LRP4: Low-density lipoprotein receptor-related protein 4

MGFA: Myasthenia Gravis Foundation of America

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MG: miastenia gravis

MuSK: kinasa específica muscular

RACh: receptor de acetilcolina

TAMG: thymoma associated myasthenia gravis

Teff: linfocitos T efectores

TPMT: tiopurina metiltransferasa

Treg: linfocitos T reguladores

UNM: unión neuromuscular

v.o.: vía oral

ÍNDICE

RESUMEN.....	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 DEFINICIÓN DE MIASTENIA GRAVIS.....	17
1.2 HISTORIA.....	17
1.3 FISIOPATOLOGÍA.....	18
1.3.1 La unión neuromuscular	18
1.3.2 Autoanticuerpos	19
1.3.4 Patogénesis	21
1.4 EPIDEMIOLOGÍA.....	27
1.5 CLINICA	28
1.6 DIAGNÓSTICO	29
1.6.1 Exploración física	29
1.6.2 Determinación de autoanticuerpos en suero.....	30
1.6.3 Estudios neurofisiológicos	30
1.6.4 Tests farmacológicos.....	30
1.7 TRATAMIENTO	31
1.7.1 Tratamiento farmacológico	32
1.7.2 Timectomía	34
1.8 PRONÓSTICO.....	35
2. HIPÓTESIS.....	39
2.1 HIPÓTESIS GENERAL.....	41
2.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	41
2.2.1 Fisiopatología de la MG asociada a timoma	41
2.2.2 Características clínicas y pronósticas de la MG asociada a timoma.....	41
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	45
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	45
4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES	47
4.1 ARTÍCULO 1.....	49
4.2: ARTÍCULO 2.....	61
5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS	75
6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN.....	81
7. CONCLUSIONES.....	87

8. LÍNEAS DE FUTURO	91
9. BIBLIOGRAFÍA.....	95

RESUMEN

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos frente a antígenos de la unión neuromuscular. Se caracteriza por una gran variabilidad clínica y fisiopatológica lo que permite clasificar a los pacientes en diferentes subtipos en función del tipo de anticuerpo, la patología tímica asociada, la edad de inicio y la distribución de las manifestaciones clínicas. Un conocimiento adecuado de cada uno de estos subtipos ayuda a establecer un pronóstico individualizado y estrategias terapéuticas adaptadas a cada paciente. En torno a 10-15% de los pacientes con MG asocian timoma. La fisiopatología y el pronóstico de este subtipo de la enfermedad ha sido poco estudiado con resultados discordantes. El objetivo de esta tesis es estudiar los mecanismos fisiopatológicos, las manifestaciones clínicas y el pronóstico en los pacientes con MG asociada a timoma.

En el primer artículo de esta tesis nos propusimos estudiar el papel del CTLA4 en el origen de la autoinmunidad en los pacientes con MG asociada a timoma. CTLA4 es un receptor expresado en la superficie de los linfocitos T reguladores (Treg) implicado en el control de la autoinmunidad. Polimorfismos en el gen *CTLA4* se han relacionado con el desarrollo de MG en la población general y específicamente en pacientes con timoma. Se desconoce si estos polimorfismos tienen un efecto sobre la expresión de CTLA4 a nivel tímico. Con el objetivo de aclarar este punto realizamos un estudio retrospectivo incluyendo a todos los pacientes con timoma intervenido en nuestro centro entre enero de 2010 y diciembre de 2020. Incluimos 10 muestras control de timos normales. Determinamos la cantidad de células CTLA4 positivas en las muestras de timoma preservadas en parafina mediante inmunohistoquímica. También contamos el número de células BCL6 positivas (linfocitos de los centros germinales) y CD4-FOXP3 (linfocitos T reguladores). Estudiamos la relación entre expresión de CTLA4 y la probabilidad de desarrollar MG, así como con la gravedad y respuesta a tratamiento de esta. Secuenciamos el gen CTLA4 y determinamos la relación entre los polimorfismos encontrados, la expresión de CTLA4 y el riesgo de desarrollar MG.

En este estudio se incluyeron las muestras de 41 pacientes con timoma. 23 (56,1%) asociaban MG. Los pacientes con MG presentaron menos células CTLA4 positivas que los pacientes con timoma sin MG: 69,3 cel./mm² (IC 95%: 39,6–99,1) vs 674,4 cel./mm² (IC 95%: 276,0–1024,0), p=0,001 y que los controles (200.74 [IC95%: 57.9–343.6] cel./mm²; p = 0.02). No encontramos diferencias significativas en el número de linfocitos de centros germinales ni T reguladores entre pacientes con y sin MG. Tampoco encontramos asociación entre la expresión de CTLA4 y la gravedad o la respuesta a tratamiento de la MG. Encontramos dos

polimorfismos en el gen *CTLA4* en los pacientes con timoma. Uno de ellos (rs231775) se relacionó con una expresión menor de CTLA4 en el timo y con un riesgo aumentado de MG, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En conclusión, en los pacientes con timoma una expresión menor de CTLA4 en el timo parece predisponer al desarrollo de MG. Esta expresión podría tener una base genética, aunque harían falta estudios con un mayor número de muestras para poder confirmarlo.

En el segundo estudio nos propusimos estudiar las características clínicas y pronósticas de los pacientes con MG asociada a timoma. Para ello utilizamos el Registro Español de Enfermedades Neuromusculares. Incluimos todos los pacientes de más de 18 años con diagnóstico de MG y anticuerpos positivos para el receptor de acetilcolina (RACh). Comparamos diferentes variables clínicas entre pacientes con y sin timoma y analizamos si la recidiva del timoma o la presencia de lesiones no resecables influyen en el pronóstico de la MG.

Incluimos a 964 pacientes con MG. 148 (15,4%) asociaron timoma. El tiempo de seguimiento medio fue de 4,6 años. En comparación con los pacientes sin timoma, los pacientes con timoma iniciaron la enfermedad a edad más precoz (52,0 vs. 60,4 años; $p < 0.001$), tuvieron síntomas más graves al inicio de la enfermedad según la escala Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) (OR:1,6; IC 95%: 1.15–2.21 $p=0,005$), así como a lo largo y al final del seguimiento. En este grupo encontramos además mayor tasa de farmacorresistencia (OR:2,28; IC95%: 1.43–3.63; $p=0,001$) y de mortalidad (HR: 2,46; IC95%: 1.47–4.14 $p=0,001$). De los 27 pacientes que tuvieron una recidiva del timoma esta coincidió con un empeoramiento de los síntomas miasténicos en 13. 12 de los 15 pacientes con lesiones tumorales no resecables presentaron un mal control de los síntomas miasténicos. En conclusión, los pacientes con MG asociada a timoma presentan formas más graves de la enfermedad y peor pronóstico a largo plazo.

La MG asociada a timoma es por lo tanto un subtipo con características fisiopatológicas y clínicas específicas. Un conocimiento detallado de sus peculiaridades permite un abordaje individualizado de cada paciente, así como el desarrollo de terapias específicas.

ABSTRACT

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease mediated by antibodies against antigens of the neuromuscular junction. Differences in clinical presentation, age at onset, autoantibody profile, and coexisting thymic pathology allow identification of different MG clinical subtypes. Appropriate knowledge of these subtypes helps to establish an individualized prognosis and patient-based therapeutic strategies. Up to 10%-15% of patients with MG have a thymoma. The exact mechanisms triggering and perpetuating the intra-thymic autoimmune response to AChR in patients with thymoma associated myasthenia gravis (TAMG) are still not fully understood. Several small studies have analyzed the clinical characteristics and prognosis of TAMG patients, but results have been inconsistent. The aim of this was to investigate the pathophysiological mechanisms, clinical manifestations, and prognosis of patients with TAMG.

In the first paper, we studied the role of CTLA4 in triggering autoimmunity in patients with thymoma. CTLA4 is a receptor expressed on the surface of regulatory T cells involved in controlling autoimmunity. Polymorphisms in the *CTLA4* gene have been associated with MG in the general population and specifically in patients with thymoma but it is unknown whether these polymorphisms are related to abnormal thymic CTLA4 expression. We conducted a retrospective study of all patients surgically treated for thymoma between January 2010 and December 2020, with and without MG. We obtained ten samples from normal thymuses as controls. We determined the number of CTLA4-positive cells, follicular activated lymphocytes, and regulatory T cells in paraffin-embedded thymoma samples. We evaluated the association between thymic expression of CTLA4 and the development of MG, as well as its severity and response to treatment. We also sequenced the *CTLA4* gene and evaluated possible associations between polymorphisms, thymic CTLA4 expression and the risk of developing MG.

Our study included 41 patients with thymoma, of which 23 had comorbid MG (56.1%). Patients with MG had fewer CTLA4-positive cells in the thymoma than non-MG patients: 69.3 (95%CI: 39.6–99.1) vs 674.4 (95%CI: 276.0–1,024.0) cells/mm²; $p = 0.001$ and vs controls (200.74 [57.9–343.6] cells/mm²; $p = 0.02$). No between-group differences (MG vs non-MG) were observed in the number follicular activated lymphocytes or T regulatory cells. CTLA4 expression was not associated with differences in MG outcome or treatment refractoriness. Two polymorphisms were detected in the *CTLA4* gene and, although MG was present in a similar proportion of patients for all genotypes, a nonsignificant trend toward a

lower CTLA4-positive cell count and a higher risk of developing MG was observed among carriers of the rs231775 polymorphism. In conclusion, a lower expression of CTLA4 in the thymus of patients with thymoma seems to predispose to the development of MG, and this expression could have a genetic basis, although larger studies are needed to confirm it.

In the second study we analyzed the clinical and prognostic characteristics of patients with TAMG. We included all patients over 18 years of age diagnosed with MG and positive anti-acetylcholine receptor antibodies from the Spanish Registry of Neuromuscular Diseases. We compared clinical data between thymomatous and nonthymomatous patients. The prognosis of patients with recurrent or nonresectable thymomas was also assessed.

A total of 964 anti-AChR positive myasthenic patients were included, with 148 (15.4%) having a thymoma. The median follow-up time was 4.6 years. TAMG patients had a younger age at symptoms onset (52.0 vs. 60.4 years, $p < 0.001$), and more severe clinical forms according to the Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) scale (OR: 1.6, 95% CI: 1.15–2.21, $p = 0.005$) both at onset and during follow-up. Treatment refractoriness and mortality were also higher (OR: 2.28, 95%CI: 1.43–3.63, $p = 0.001$; HR: 2.46, 95% CI: 1.47–4.14, $p = 0.001$). Myasthenic symptoms worsened in 13 of 27 patients with recurrences, while 13 out of 15 patients with nonresectable thymomas had severe, treatment-refractory MG symptoms. In conclusion, patients With TAMG had more severe myasthenic symptoms and worse prognosis.

TAMG represents a disease subtype with specific pathophysiological and clinical characteristics. A detailed understanding of its specificities allows for an individualized approach and the development of specific therapies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN DE MIASTENIA GRAVIS

La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune producida por autoanticuerpos contra proteínas postsinápticas de la unión neuromuscular. Se manifiesta con debilidad y fatigabilidad muscular.

1.2 HISTORIA

La primera descripción de un paciente con síntomas compatibles con miastenia gravis fue realizada en 1672 por Thomas Willis en *De Anima Brutorum* en la que se menciona a una mujer con "debilidad muscular fluctuante no solo en los miembros sino también en la lengua". Posteriormente se describen nuevos casos similares. Fue en 1895 cuando Friedrich Jolly introduce por primera vez el término miastenia gravis pseudoparalítica para referirse a esta patología¹.

Inicialmente el único tratamiento que podía ofrecerse a estos pacientes era el reposo. No fue hasta 1934 cuando se halló el primer tratamiento farmacológico eficaz. Debido a la analogía existente entre los síntomas miasténicos y la intoxicación por curare se probó el antídoto de este último, la fisostigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa con el que se objetivó una desaparición transitoria de todos los síntomas². Esto supuso no sólo la disponibilidad de un grupo de fármacos eficaces que continúan siendo ampliamente utilizados en la actualidad si no una evidencia clara de que el origen de la enfermedad se debía a una disfunción a nivel de la unión neuromuscular y de que en esta disfunción estaba probablemente implicada la acetilcolina.

Fue años más tarde en la década de los 60 cuando se postuló el origen autoinmune de la enfermedad tras varios experimentos en los que se observó fijación de inmunoglobulinas presentes en el suero de los pacientes en la superficie de las fibras musculares³. Esto derivó en la utilización exitosa de corticosteroides y otros inmunosupresores que continúan siendo la base del tratamiento de la MG hoy en día. La demostración de la existencia de anticuerpos con afinidad por las mismas regiones que la bungarotoxina⁴ en gran parte de los pacientes con MG fue clave para el descubrimiento de la diana de los anticuerpos más frecuentes en la enfermedad: el receptor de acetilcolina (RACCh).⁵ La patogenicidad de los anticuerpos anti-RACCh fue posteriormente confirmada mediante estudios de inoculación en animales.⁶ Aproximadamente un 20% de los pacientes con miastenia gravis no presentan anticuerpos anti-RACCh. En 2001, Hoch et al. describieron una nueva diana antigénica ante la cual el 70%

de pacientes miasténicos sin anticuerpos contra el receptor de acetilcolina producían anticuerpos: el receptor tirosina kinasa músculo específico (MuSK).⁷

La relación entre miastenia gravis y timo se constató de forma precoz tras la descripción de la enfermedad al analizar autopsias de pacientes y encontrarse frecuentemente tumores en esta localización. En 1913 se realizó la primera timectomía a un paciente con MG. Esta se realizó sin intención terapéutica como parte de una tiroidectomía por un hipertiroidismo concomitante. Para sorpresa de sus médicos el paciente mejoró considerablemente de sus síntomas miasténicos.⁸ A pesar de este hallazgo que fue replicado en posteriores observaciones, los problemas técnicos y las complicaciones que comportaba la toracotomía así como la falta de homogeneidad o de calidad en los estudios han hecho que la eficacia de la timectomía no haya podido ser demostrada hasta muy recientemente⁹.

1.3 FISIOPATOLOGÍA

1.3.1 La unión neuromuscular

La unión neuromuscular (UNM) es una sinapsis especializada en transmitir una señal eléctrica desde la terminal nerviosa de la motoneurona hasta la fibra muscular lo que da lugar a la contracción muscular. La unión neuromuscular se compone de 3 elementos principales:

- La porción presináptica: compuesta por la porción terminal del nervio motor que forma un botón sobre la superficie de la fibra muscular. Dentro de ella se encuentran las vesículas de acetilcolina (ACh). Cuando un potencial de acción llega a la terminal nerviosa se produce la activación de los canales de calcio voltaje-dependientes con la consiguiente entrada de calcio al interior de la neurona. Esto produce la fusión de las vesículas de acetilcolina con la membrana celular y la liberación de esta al exterior.

-La hendidura sináptica: es el espacio existente entre la terminal nerviosa y la fibra muscular al cual se libera la acetilcolina. Contiene la enzima acetilcolinesterasa que hidroliza la acetilcolina produciendo la terminación de la señal.

-La porción postsináptica: es una región especializada de la superficie de la fibra muscular. Se organiza formando pliegues enfrentados a la terminal nerviosa. En ella encontramos los receptores de acetilcolina nicotínicos. Estos receptores forman canales transmembrana que tras la unión de la acetilcolina sufren un cambio conformacional que permite su apertura y la

consiguiente entrada de sodio al interior de la fibra muscular. Esta entrada es la que desencadena los diferentes procesos que llevan a la contracción muscular.

Para mantener la funcionalidad de la UNM es necesario que exista una alta densidad de receptores de acetilcolina a nivel de la membrana postsináptica. Diferentes proteínas expresadas a nivel pre y post-sináptico se encargan de mantener la agregación de los RACH. La agrina, un componente de la lámina basal secretado por la terminal nerviosa se une a la proteína de la membrana muscular postsináptica LRP4 produciendo su interacción con la kinasa específica muscular (MuSK) otra proteína de la membrana postsináptica. Esta interacción es necesaria para la activación de MuSK y su posterior unión a Dok7 formando un complejo capaz de activar una cascada de señalización intracelular que desemboca en la fosforilación de los RACH. Esta fosforilación permite la unión de la rapsina que facilita la conformación de agregados de RACH.

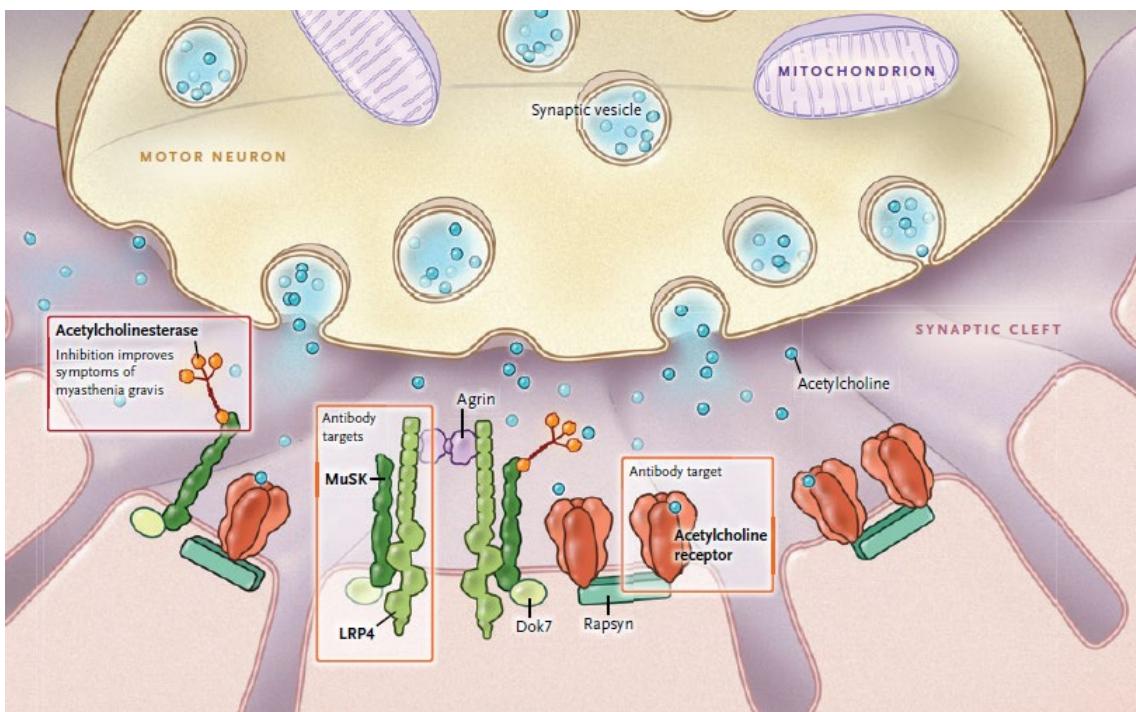


Fig. 1: Estructura esquemática de la unión neuromuscular. Extraído de Gilhus et al⁹⁰.

1.3.2 Autoanticuerpos

La miastenia gravis es una enfermedad mediada por anticuerpos. El 80% de los pacientes presenta anticuerpos anti-RACH. Estos son del tipo IgG1 e IgG3 y actúan a nivel postsináptico mediante 3 mecanismos principales (ver Fig. 2): 1) activación del complemento con lisis y lesión estructural de la UNM, 2) cross-linking de los RACH produciendo internalización y

degradación de estos, 3) bloqueo funcional de los RACH.¹⁰ No existe una clara correlación entre los títulos de anticuerpos anti-RACH y la gravedad o pronóstico de la enfermedad.¹¹

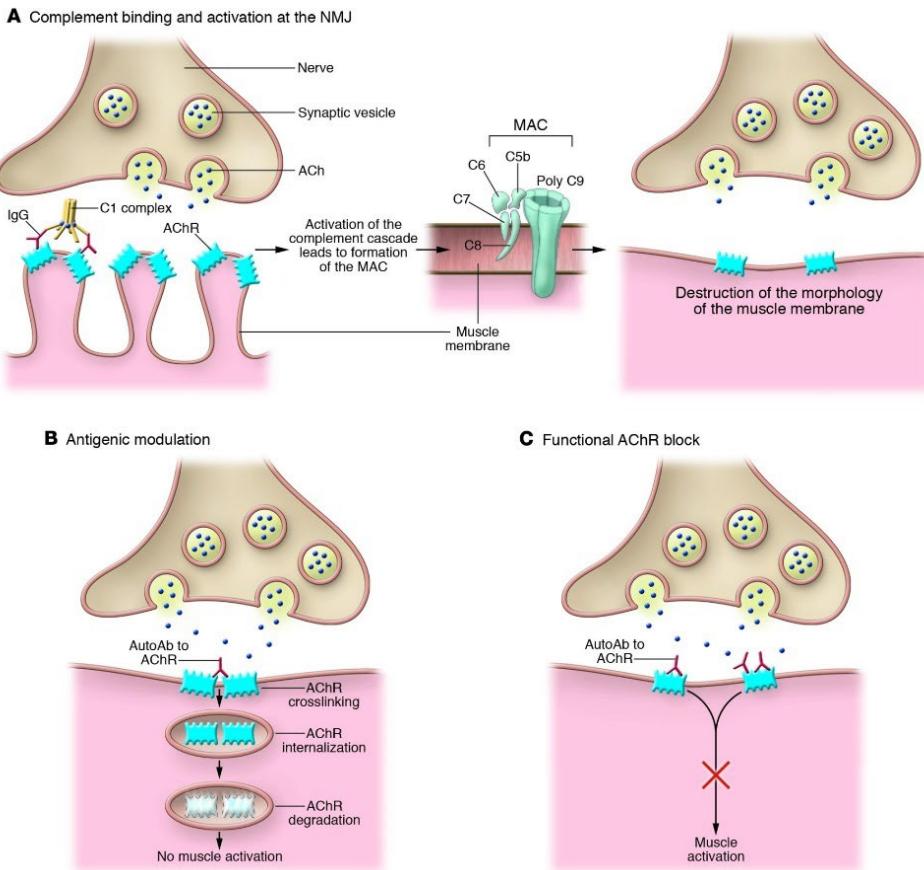


Fig. 2: Mecanismos de acción de los anticuerpos anti-RACH. Extraído de Conti-Fine et al.¹² La unión del anticuerpo al AChR activa la cascada del complemento, lo que resulta en la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y la destrucción localizada de la membrana postsináptica de la UNM con pérdida de los pliegues necesarios para su función. (B) El anticuerpo se fija a dos receptores de ACh lo que provoca la endocitosis de estos y su degradación. (C) La unión de los anticuerpos al sitio de unión de ACh del RACH provoca un bloqueo funcional al interferir con la unión de ACh.

El 5% de los pacientes con MG generalizada presenta anticuerpos anti-MuSK. Estos son de clase IgG4 no teniendo capacidad de activar el complemento. Se unen a MuSK en la zona de interacción con LRP4 impidiendo la interacción de estas dos proteínas lo que interrumpe la cascada de activación necesaria para la agregación de los RACH en la unión neuromuscular.¹⁰

En torno a un 15% de las MG generalizadas y un 50% de las oculares no presentan anticuerpos anti-RACH ni anti-MuSK. Este tipo de MG se denomina seronegativa. Estos pacientes presentan anticuerpos frente a otros antígenos extra o intracelulares de región

postináptica de la unión neuromuscular o bien frente a antígenos no identificados hasta la fecha.

-Anticuerpos antiLRP4: LRP4 es una proteína transmembrana que se une a la agrina liberada por la terminal nerviosa iniciando la vía de señalización mediada por MuSK que promueve la agregación de los anticuerpos anti-RACCh. La prevalencia de estos autoanticuerpos difiere de forma importante entre estudios con valores que oscilan entre 0.8 y 45% de los pacientes con MG y se asocia a síntomas más graves que el resto de pacientes con MG seronegativa.¹³ Su patogenicidad ha sido demostrada en estudios animales.¹⁴

-Anticuerpos anticortactin: fueron descritos en 2014 por nuestro grupo.¹⁵ Cortactin es una proteína intracelular implicada en la vía de señalización agrina/LRP4/MuSK que promueve la agregación de los anticuerpos anti-RACCh. El 19,7% de los pacientes con MG seronegativa, el 4,8% de las seropositivas, el 12,5% de los pacientes con otras enfermedades autoinmunes y el 5,2% de los controles sanos presenta anticuerpos anticortactin.¹⁶ Los pacientes con MG asociada a anticuerpos anti-cortactin tienen un fenotipo ocular o generalizado leve sin síntomas bulbares.¹⁷

-Anticuerpos anti-músculo estriado: dirigidos fundamentalmente contra la titina y el receptor de rianodina, ambas proteínas intracelulares expresadas a nivel muscular. No tienen carácter patogénico pero su presencia se asocia con timoma, edad de inicio tardío y con un peor pronóstico de la enfermedad, suelen presentarse junto con ac anti-RACCh.¹⁸

-Otros anticuerpos que se han relacionado con la MG son anti-Kv1.4¹⁹, anti-ColQ²⁰ y anti-agrina.²¹ Su papel patógeno no se ha aclarado hasta el momento, así como tampoco se han relacionado con un cuadro clínico específico. Por ello su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad es discutido requiriéndose la realización de más estudios.²²

1.3.4 Patogénesis

Se considera a la MG como paradigma de las enfermedades mediadas por anticuerpos debido a la extensa caracterización de los principales autoanticuerpos y antígenos diana que intervienen en la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos que desencadenan la producción de estos autoanticuerpos son poco conocidos.

-Factores inmunológicos

Los diferentes anticuerpos causantes de la enfermedad son producidos por un grupo reducido de clones de células B autorreactivas. Estos clones se generan y proliferan debido a una

desregulación en los mecanismos de control de los linfocitos B, ya sea por una selección positiva excesiva o por un defecto en los mecanismos de selección negativa. Tanto en la selección positiva como negativa de las células B los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel fundamental. Se distinguen dos subpoblaciones principales de linfocitos T CD4+: los CD4+ efectores (Teff) que activan la respuesta inmunitaria y los CD4+ reguladores (Treg) que tienen un papel inhibidor o inmunomodulador. En situaciones normales las células Teff autorreactivas que escapan a los mecanismos de autotolerancia son inhibidas por los linfocitos Treg. Estos últimos se identifican por la expresión del factor de transcripción FOXP3.

Se postula que la MG podría deberse a un desequilibrio entre la acción de las células Teff y Treg. Diversos estudios muestran un aumento de varios subtipos de linfocitos T CD4+ efectores circulantes^{20, 21} en los pacientes con MG asociada a anticuerpos anti-RACCh. La mayoría de los estudios no detecta diferencias en cuanto a número absoluto ni relativo de Tregs en sangre periférica ni en el timo de pacientes con y sin MG. Sin embargo, sí se ha objetivado la existencia de defectos funcionales en los Treg tanto tímicos como circulantes de los pacientes con MG^{25,26} con una menor capacidad de supresión de los linfocitos Teff in vitro.²⁷ Se desconoce si esta disfunción es un factor preexistente que desencadena la autoinmunidad o bien es un epifenómeno que se produce dentro del contexto inflamatorio de la enfermedad.

-Patología tímica

El timo es un órgano linfoide primario que juega un papel esencial en la maduración de los linfocitos T. Está compuesto por dos tipos celulares principales: células epiteliales y linfocitos en proceso de maduración. Se organiza en dos regiones funcionales diferentes: la corteza y la médula. Los linfocitos T inmaduros procedentes de la médula ósea penetran en la corteza tímica donde comienzan a reordenar sus receptores T para generar receptores específicos para múltiples antígenos. Cada linfocito T con su receptor T específico debe pasar una serie de puntos de control en el timo antes de convertirse en un linfocito maduro. Estos procesos de control están mediados por las células tímicas epiteliales que funcionan como células presentadoras de antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El primer control tiene lugar en la corteza y consiste en la selección positiva de linfocitos T. Sólo los linfocitos que son capaces de reconocer al antígeno unido al MHC son seleccionados. En un segundo tiempo, los linfocitos migran hacia la región medular donde se produce la selección negativa que consiste en la eliminación de los linfocitos T autorreactivos. Finalmente, estos linfocitos pasan a la circulación como linfocitos T maduros. El timo realiza estas funciones

principalmente durante los primeros años de vida y, a partir de la adolescencia, entra en un proceso fisiológico de involución.²⁸

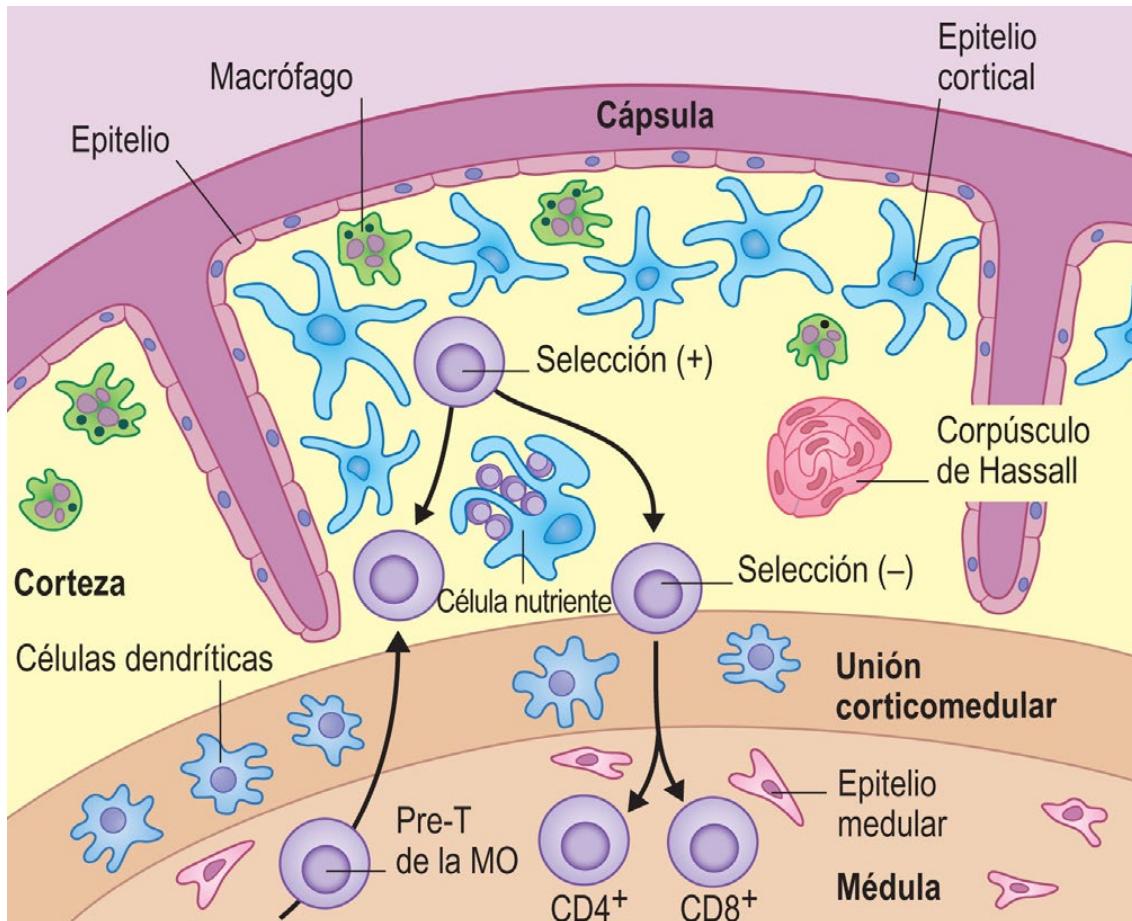


Fig. 3: Maduración de los precursores linfocíticos en el interior del timo.
Extraída de “Inmunología clínica: Principios y práctica” Rich R. 5^a Edición.²⁹

El timo es un órgano crucial en la patogénesis de la MG. Aproximadamente un 80% de los pacientes con MG presentan alteraciones morfológicas en el timo. Estas alteraciones se han relacionado exclusivamente con la MG asociada a anticuerpos anti-RACH y pueden ser de dos tipos:

Hiperplasia folicular: más frecuente en pacientes jóvenes. Se forman numerosos centros germinales donde se produce la maduración de los linfocitos B autorreactivos productores de anticuerpos anti-RACH. Esto explicaría la mejoría de los síntomas miasténicos que se produce en estos pacientes tras la timectomía. Existen dudas sobre cuáles son las causas iniciales que desencadenan esta producción de autoanticuerpos. Se cree que la expresión de fragmentos de RACH por medio de moléculas de MHC de clase II en la superficie de las células epiteliales del timo hiperplásico desencadena la activación de linfocitos T CD4+ autorreactivos que a su vez activa la producción de anticuerpos anti-RACH por parte de los linfocitos B. Estos anticuerpos se unirían a los RACH presentes de forma fisiológica en la superficie de las células mioides del

timo. Los complejos antígeno-anticuerpo formados activarían células presentadoras de antígeno (APC) que retroalimentarían la activación de linfocitos T CD4+ autorreactivos aumentando la producción de anticuerpos anti-RACCh maduros frente a distintos epítopos.³⁰

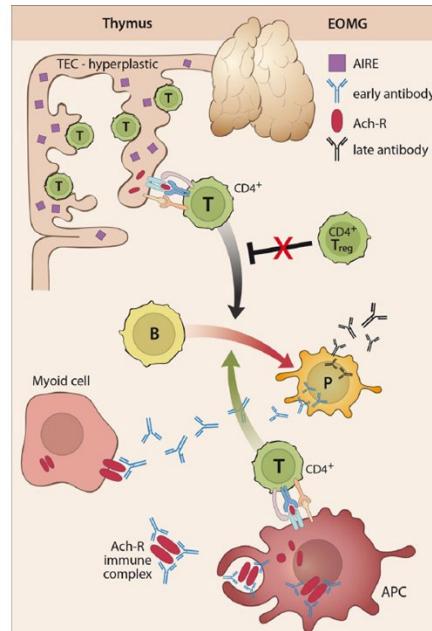


Fig. 4: Patogénesis de la miastenia gravis asociada a hiperplasia tímica. Extraída de Melzer et al.²⁸

Timoma: El timoma es una neoplasia de las células epiteliales del timo, la cual se ha asociado a diferentes enfermedades autoinmunes.³¹ La MG es la enfermedad autoinmune más frecuentemente relacionada con el timoma. Entre el 10 y el 20% de los pacientes con MG presentan un timoma, y aproximadamente el 30% de pacientes con timoma padecen MG.³² La edad de inicio de la MG en estos casos suele ser más tardía que en los pacientes con MG asociada a hiperplasia folicular, en torno a los 50 años.

La clasificación histológica más utilizada actualmente es la de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual diferencia distintos subtipos de timoma en función de la morfología y proporción de células epiteliales y linfocitarias (ver tabla 1). Los subtipos más frecuentemente asociados con MG son los B1 y B2, siendo estos los tumores con mayor proporción de linfocitos.³³

Subtipo OMS:	Composición:
A	Células epiteliales con morfología fusiforme.
AB	Células epiteliales fusiformes con presencia de linfocitos inmaduros en cantidad variable.
B1	Células epiteliales de morfología poligonal con abundante presencia de linfocitos inmaduros.
B2	Células epiteliales de morfología poligonal con moderada presencia de linfocitos inmaduros.
B3	Células epiteliales de morfología poligonal con escasa presencia de linfocitos inmaduros.
C	También llamado carcinoma tímico. Compuesto por células epiteliales con marcada atipia.

Tabla 1: Clasificación histológica de la OMS de los timomas.

Los timomas son tumores de crecimiento lento (con la excepción de los de tipo C) encontrándose la mayoría de veces en estadíos localizados o con mínima invasión de tejidos circundantes y con una supervivencia del 95% a los 5 años.³⁴ Sin embargo, en un 7% de los pacientes el timoma se diagnostica en estadíos avanzados con diseminación pleural. Uno de los sistemas de estadiaje más utilizados es la clasificación de Masaoka (ver tabla 2).³⁵

I	Tumor encapsulado
IIA	Invasión transcapsular microscópica
IIB	Invasión transcapsular macroscópica a tejido graso peritímico
III	Invasión de órganos vecinos
IVA	Diseminación pleural o pericárdica
IVB	Metástasis a distancia

Tabla 2: Estadiaje del timoma según la clasificación de Masaoka.³⁵

El tratamiento del timoma consiste en la extirpación completa. En el 17% de los pacientes persisten lesiones no resecables tras la timectomía.³⁴ En estos casos y en los casos con invasión local o a distancia está indicado el tratamiento adyuvante con radioterapia y/o quimioterapia. Las recurrencias son poco frecuentes, apareciendo en un 8% de los pacientes.³⁶

En comparación con la MG asociada a hiperplasia folicular, el origen de la autoinmunidad en la MG asociada a timoma está menos establecido y la respuesta a la timectomía es menor. Los

timomas contienen linfocitos T CD4+ y CD8+ policlonales procedentes de precursores de la médula ósea que juegan un papel central en la patogénesis de la MG. En los pacientes con timoma y MG existe un desequilibrio en el número de linfocitos T CD4+ con exceso de células efectoras y un defecto en reguladoras tanto a nivel tímico como en sangre periférica.^{37,38} Esta desregulación en la composición linfocitaria en el timo conduciría a la activación de linfocitos B autorreactivos a nivel de centros germinales situados en el tejido peritumoral donde se llevaría a cabo la producción de anticuerpos anti-RACCh.³⁹ Se desconoce cuál es el proceso inicial que provoca este desequilibrio. Varios estudios apuntan a un defecto en el regulador autoinmune AIRE que estimula la presentación de autoantígenos por las células epiteliales del timo favoreciendo así la tolerancia inmunológica. La expresión de AIRE se encuentra directamente relacionada con la expresión del RACCh en las células epiteliales tímicas.⁴⁰ AIRE se expresa de forma deficiente en el interior del timoma⁴¹ aunque sin diferencias entre pacientes con y sin MG.⁴² Por lo tanto, el motivo por el cual unos pacientes con timoma desarrollan MG y otros no sigue siendo desconocido.

-Factores genéticos

La MG tiene una concordancia superior en gemelos homocigóticos (35,5%) en comparación con los heterocigóticos (5%) sugiriendo la existencia de un componente genético importante.⁴³ Diversos polimorfismos en genes relacionados con la inmunidad (HLA, PTPN22, IL4R α , IL10...) se han asociado con una mayor susceptibilidad para desarrollar miastenia gravis en estudios de genes candidatos.⁴⁴

Recientemente un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) realizado en pacientes con MG con anticuerpos anti-RACCh encontró asociación entre 3 polimorfismos y el desarrollo de MG: rs231770 en CTLA4, rs9271871 en HLA-DQA1 y rs4263037 en TNFRSF11A.⁴⁵ Polimorfismos en el gen CTLA4 habían sido previamente relacionados con diversas enfermedades autoinmunes incluyendo la MG.⁴⁶⁻⁴⁹ Uno estos estudios encontró una frecuencia más baja del alelo de 86 repeticiones en una región de microsatélites (AT)n del gen CTLA4 en pacientes con MG asociada a timoma en comparación con pacientes con MG sin timoma.⁵⁰ En otro estudio se relacionó el genotipo CTLA4 49A/A con una mayor probabilidad de desarrollar MG en pacientes con timoma.⁵¹ Otro hecho que implica a este receptor en la patogénesis de la MG es que inhibidores del CTLA-4 utilizados en el tratamiento de varias neoplasias tienen entre sus efectos secundarios el desarrollo de MG.⁵² Estos hallazgos sugieren una asociación entre CTLA4 y el desarrollo de MG con anticuerpos anti-RACCh positivos. Esta asociación parece ser especialmente relevante en pacientes con timoma, pero sus mecanismos

aún no están claros. El gen *CTLA4* codifica el antígeno citotóxico asociado a linfocitos T (CTLA-4), un receptor de superficie expresado por los linfocitos T (principalmente por el subtipo T reg). Actúa como correceptor inhibitorio del TCR de forma que cuando este último se une al antígeno presentado por el MHC de la célula presentadora de antígenos CTLA4 se une a su ligando CD80 o CD86 (también denominados B7) produciendo una inhibición de la respuesta inmune. Si en lugar de CTLA4 el correceptor del linfocito T que se une a B7 es CD28, se produce una respuesta activadora de la inmunidad. Se desconoce el mecanismo mediante el cual CTLA4 inhibe la respuesta inmune aunque se piensa que pueda hacerlo mediante competición con el CD28 o promoviendo la transendocitosis de este.⁵³ CTLA-4 se expresa principalmente en la superficie de los linfocitos Treg, que como se ha dicho previamente tienen una función anormal en pacientes con MG. Se desconoce cómo los polimorfismos descritos influyen en la expresión de CTLA4 o si estos polimorfismos influyen en la disfunción de los linfocitos Treg observada en los pacientes con MG.

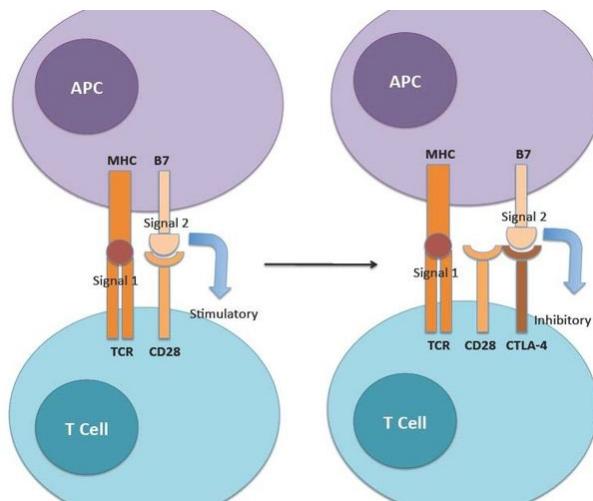


Fig. 5: Función del CTLA-4 como correceptor inhibitorio del TCR. Extraída de Longoria et al.⁵⁴

1.4 EPIDEMIOLOGÍA

La miastenia gravis tiene una incidencia que varía entre 1,7 y 21,3 casos por millón de habitantes por año y una prevalencia entre 15 y 179 casos por millón de habitantes. Afecta a ambos性es y puede aparecer a cualquier edad, aunque existe una distribución bimodal de la edad de presentación con un pico de incidencia en jóvenes (25-35 años) entre los que predominan las mujeres y un segundo pico en mayores de 50 años entre los que predominan los varones. En las últimas décadas se ha ido evidenciando un aumento progresivo de la incidencia de la enfermedad.⁵⁵ Esto traduce probablemente una mejora en el diagnóstico,

aunque sin poder descartar un incremento real de la incidencia por modificaciones en factores ambientales hasta ahora desconocidos. Por otra parte, en los estudios epidemiológicos más recientes se observa un aumento progresivo en la edad de inicio de la enfermedad siendo cada vez más frecuente la miastenia gravis de inicio muy tardío (>65 años) frente a la miastenia gravis de inicio precoz (<50 años) y tardío (50-65 años).⁵⁶⁻⁵⁸

1.5 CLINICA

Los síntomas cardinales de la MG son la debilidad y la fatigabilidad muscular. La fatigabilidad consiste en la aparición de debilidad o el empeoramiento de la debilidad existente tras el ejercicio. Por ello es frecuente que los síntomas sean fluctuantes y empeoren al final del día.

La musculatura más frecuentemente afectada en la MG es la periocular lo que se manifiesta con ptosis y diplopia. Cuando la debilidad se limita a la musculatura periocular se clasifica la enfermedad como MG ocular. Cuando la debilidad afecta a la musculatura extraocular (con o sin afectación ocular) la MG se clasifica como generalizada. Dentro de este subgrupo la debilidad puede afectar tanto a las extremidades como a la musculatura bulbar, manifestándose en este último caso con disartria y disfagia. Es frecuente también la debilidad facial y masticatoria. En los casos más graves se afecta también la musculatura respiratoria.

El grado de afectación es muy variable de un individuo a otro y de un momento de la evolución de la enfermedad a otro. El 50% de los pacientes presentan un inicio ocular, aunque la mayoría desarrollará síntomas extraoculares a lo largo de la evolución de la enfermedad. Sólo en el 15% de los pacientes la debilidad permanecerá restringida a la musculatura ocular durante todo el curso de la enfermedad. Los pacientes suelen alternar períodos de mejoría o remisión clínica con períodos de empeoramiento. Estos empeoramientos pueden desencadenarse por cambios en la medicación, enfermedades intercurrentes, estrés o bien sin causa aparente. La forma más grave de presentación clínica es la crisis miasténica en la que se produce fallo ventilatorio con necesidad de ventilación.

Los pacientes con anticuerpos diferentes a los anti-RACh presentan manifestaciones clínicas específicas. Los pacientes con anticuerpos antiMuSK presentan más frecuentemente formas generalizadas con afectación bulbar frecuente. Son habituales la debilidad facial y atrofia lingual.⁵⁹ Los pacientes con MG seronegativa suelen presentar formas oculares o generalizadas leves.

La escala MGFA clasifica a los pacientes con miastenia gravis en función de la localización de la debilidad y la gravedad de esta:

Clase I Debilidad ocular. Puede tener debilidad para la oclusión palpebral. Resto de la fuerza muscular normal.

Clase II Debilidad generalizada leve; puede existir además debilidad ocular de cualquier gravedad.

IIA Predominantemente en miembros y/o axial.

IIB Predominantemente en musculatura bulbar y/o respiratoria.

Clase III Debilidad generalizada moderada; puede existir además debilidad ocular de cualquier gravedad.

IIIA Predominantemente en miembros y/o axial.

IIIB Predominantemente en musculatura bulbar y/o respiratoria.

Clase IV Debilidad generalizada grave; puede existir además debilidad ocular de cualquier gravedad.

IVA Predominantemente en miembros y/o axial.

IVB Predominantemente en musculatura bulbar y/o respiratoria.

Clase V Intubación orotraqueal con o sin ventilación mecánica excepto si se utiliza durante un manejo postquirúrgico rutinario.

1.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de miastenia gravis requiere en primer lugar de la existencia de síntomas y signos compatibles con la enfermedad y en segundo lugar de pruebas complementarias que se utilizan como apoyo al diagnóstico.

1.6.1 Exploración física

La exploración física en la MG se centra en demostrar debilidad muscular que empeora tras esfuerzos repetidos. Para explorar la musculatura ocular se solicita al paciente que mantenga la mirada fija durante varios segundos en un objeto en diferentes localizaciones para determinar si aparece diplopía o bien que mantenga varios segundos la mirada en supraversión para determinar si aparece ptosis. Para explorar la musculatura cervical y de extremidades se

solicita al paciente que realice elevaciones de cabeza en decúbito o de brazos hasta 90° o bien que realice sentadillas explorando la fuerza antes y después de estos ejercicios. Una variante de estas maniobras exploratorias es pedirle al paciente que mantenga cabeza, brazos o piernas elevadas y determinando el tiempo durante el cual el paciente es capaz de hacerlo. Se puede también explorar fatigabilidad en la musculatura bulbar solicitando al paciente que cuente en voz alta. La prueba del hielo que consiste en aplicar frío en el párpado es positivo si se observa una mejoría en la ptosis. Tiene una sensibilidad y una especificidad de más del 90%.⁶⁰ Existen diferentes escalas de gravedad que se basan en la exploración física siendo una de las más utilizadas la Quantitative Myasthenia Gravis (QMG).⁶¹

1.6.2 Determinación de autoanticuerpos en suero

La determinación de anticuerpos frente a uno de los principales autoanticuerpos asociados a la enfermedad (anti-RACh o anti-MuSK) supone la prueba diagnóstica más específica en un paciente con sospecha clínica de MG. La técnica de elección para la detección de estos autoanticuerpos es el radioenzimoinmunoensayo (RIA). Los otros autoanticuerpos asociados con la MG se determinan en caso de negatividad de los dos principales, aunque la disponibilidad de las pruebas de detección es más limitada.

1.6.3 Estudios neurofisiológicos

Se utilizan principalmente en casos en los que la clínica es sugestiva pero los anticuerpos son negativos. Las dos alteraciones más frecuentemente encontradas son:

-Reducción de la amplitud del potencial de acción motor tras la estimulación repetitiva a bajas frecuencias (2-3 Hz). Se considera positivo un decremento de la amplitud del cuarto potencial con respecto al primero de más del 10%. Es una técnica específica (en torno a 95%) pero poco sensible (80% en pacientes con MG generalizada grave, 30% en MG ocular).⁶²

-Aumento del jitter en el estudio de fibra única. El jitter es la variabilidad entre el tiempo de respuesta de dos fibras musculares pertenecientes a una misma unidad motora. Esta alteración tiene una elevada sensibilidad, pero su especificidad es menor encontrándose aumentado también en otras patologías neuromusculares.⁶³

1.6.4 Tests farmacológicos

Dada la especificidad de la respuesta a inhibidores de la acetilcolinesterasa se puede utilizar esta respuesta como test diagnóstico. Para ello se administra uno de estos inhibidores y se evalúa la mejoría de un parámetro clínico objetivo como puede ser la ptosis o la disartria. La

prueba del edrofonio es rápida y fácil de valorar debido a la administración intravenosa y a su reducida vida media. Sin embargo, se relaciona con efectos secundarios potencialmente graves como bradicardia por lo que debe realizarse con monitorización de constantes y disponibilidad de atropina para revertir los potenciales efectos colinérgicos. Una alternativa más segura pero más lenta es la utilización de piridostigmina oral.⁶⁴ De la misma forma que los estudios neurofisiológicos, los tests farmacológicos se han visto desplazados por la determinación de autoanticuerpos, aunque tendrían su utilidad en pacientes que requieren un diagnóstico rápido.

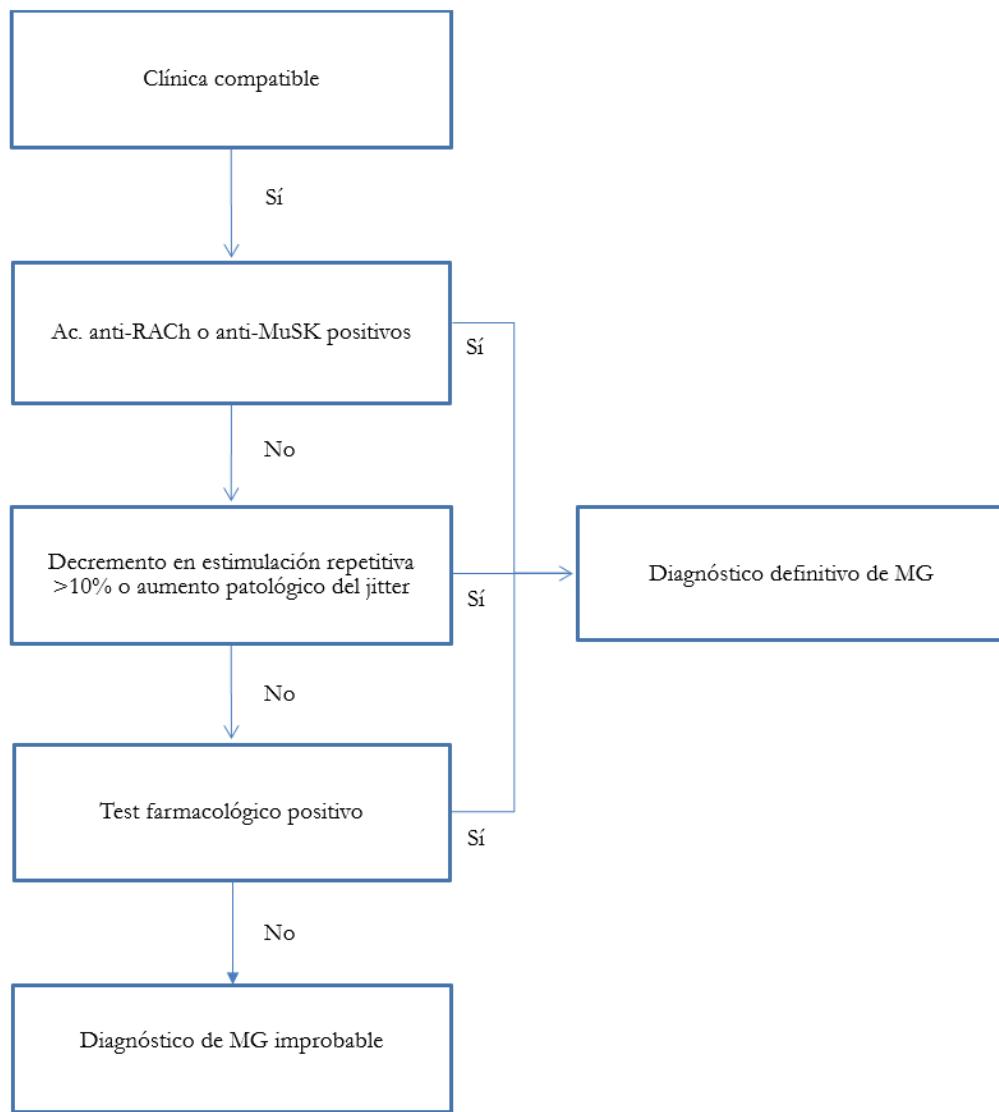


Fig. 6: Algoritmo diagnóstico de la MG. Adaptado de Gilhus et al.⁶⁵

1.7 TRATAMIENTO

Existen múltiples opciones terapéuticas eficaces para el tratamiento de la MG. Sin embargo, los efectos secundarios de los fármacos son frecuentes y hasta un 10% de los pacientes se

consideran farmacorresistentes por lo que el desarrollo de nuevos tratamientos más específicos sigue siendo necesario.

1.7.1 Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico se basa en 3 grupos de fármacos: 1) inhibidores de la acetilcolinesterasa, 2) inmunosupresores, 3) inmunomoduladores.

1) Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Se utilizan como tratamiento sintomático. Actúan aumentando la disponibilidad de acetilcolina en la hendidura sináptica. El más utilizado es la piridostigmina. Su uso como tratamiento único generalmente no permite un control completo de los síntomas siendo preciso asociar otro tipo de tratamientos. Sin embargo, en la MG ocular puede ser suficiente para un buen control de los síntomas. Su eficacia en pacientes con MG asociada a anticuerpos anti-MuSK es menor.⁶⁶

2) Inmunosupresores

En los pacientes con miastenia gravis generalizada o en aquellos con miastenia gravis ocular cuyos síntomas no se controlan adecuadamente con los inhibidores de la acetilcolinesterasa está indicado iniciar tratamiento inmunosupresor.

Los glucocorticoides son los inmunosupresores de elección al inicio por su acción rápida en comparación con otros inmunosupresores. Dentro de este grupo el más utilizado es la prednisona. Se suele iniciar a dosis de 1mg/kg/día con descenso progresivo posterior, aunque se puede empezar a dosis menores en MG ocular y generalizada leve. No es infrecuente que se produzca un empeoramiento clínico transitorio de los síntomas miasténicos al iniciar dosis altas de corticoides por lo que en algunos casos se debe valorar ingreso hospitalario para inicio de tratamiento sobre todo en pacientes con edad avanzada o síntomas bulbares. El efecto máximo del tratamiento con prednisona oral suele verse tras 4 a 6 semanas del inicio.⁶⁷

Dados los efectos adversos potencialmente graves derivados del uso prolongado de prednisona a dosis altas en muchas ocasiones es necesario añadir un segundo inmunosupresor. Entre las opciones disponibles se encuentran: azatioprina, micofenolato mofetilo, ciclosporina, ciclofosfamida, tacrolimus, metotrexato y rituximab. Como efectos secundarios generales presentan una mayor susceptibilidad para infecciones y neoplasias, aunque el riesgo es generalmente bajo. Los efectos secundarios específicos de cada fármaco se resumen junto con otras características en la tabla 3. El algoritmo terapéutico más extendido y recomendado por las guías de

práctica clínica para MG generalizada con anticuerpos anti-RACCh se refleja en la figura 6. El algoritmo de la MG con anticuerpos anti-MuSK es similar aunque en estos pacientes el Rituximab se debe plantear en etapas precoces debido a su elevada eficacia.⁶⁸

Fármaco	Posología	Inicio de acción	Nivel de evidencia	Efectos adversos principales
Azatioprina	Inicio 50mg/24h Mantenimiento: 2-3mg/kg/24h (según niveles de TPMT)	12 meses	2b	Hepatotoxicidad, toxicidad medular.
Micofenolato mofetilo	Inicio 500mg/12h Mantenimiento 1000-1500mg/12h	6-8 meses	4	Diarrea, dolor abdominal, náuseas, toxicidad medular. .
Ciclosporina	Inicio: 100mg/12h Mantenimiento: 1,5-3mg/kg/12h	1-3 meses	1b	Nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, hirsutismo, temblor, hiperplasia gingival.
Tacrolimus	Inicio: 0,05mg/kg/12h Mantenimiento: 0,1-0,2mg/kg/día, monitorizar niveles plasmáticos	1-2 meses	2b	Temblor, hiperglucemia, hipertensión, náusea, diarrea, cefalea, nefrotoxicidad, encefalopatía posterior reversible.
Ciclofosfamida	Dosis única inicial: 750mg/m ² i.v. Mantenimiento: 50mg/día v.o. 6 días a la semana, reducir progresivamente. Dosis máxima acumulada 50g.	1-3 meses	1b	Alopecia, toxicidad medular, cistitis y neoplasia urotelial.
Metotrexato	Inicio: 10mg/semana Mantenimiento: 10-20mg/semana	Desconocido	2b	Hepatotoxicidad, neumonitis intersticial.
Rituximab	375 mg/m ² semanal durante 4 semanas con 2 dosis adicionales mensuales.	1-2 meses	3a	Cefalea, náuseas, síndrome pseudogripal, citopenias.
Eculizumab	900 mg/semanal durante 4 semanas, 1200 mg la 5 ^a semana, seguidos de 1200 mg cada 2 semanas.	2-4 semanas	1b	Cefalea, meningitis meningocócica.

Tabla 3: Fármacos inmunosupresores más utilizados en MG. Adaptado de Cortés et al.⁶⁷

- 3) Inmunomoduladores: se utilizan generalmente en situaciones de urgencia en las que el paciente presenta debilidad grave o compromiso bulbar o respiratorio que deben ser resueltos de forma rápida. Tanto las inmunoglobulinas intravenosas como la plasmaférésis han demostrado similar eficacia. En algunos casos se utilizan de forma crónica para pacientes que no responden al tratamiento convencional.
- 4) Nuevas terapias: en los últimos años se han aprobado nuevas terapias eficaces en el tratamiento de la MG con mecanismos de acción más específicos. Entre ellas se encuentran los inhibidores del complemento como ravulizumab. Otro grupo de terapias prometedoras son los inhibidores del FcRn que bloquean el reciclaje intracelular de inmunoglobulinas. Dentro de este grupo se ha aprobado efgartigimod y se esperan nuevas aprobaciones en un futuro cercano.

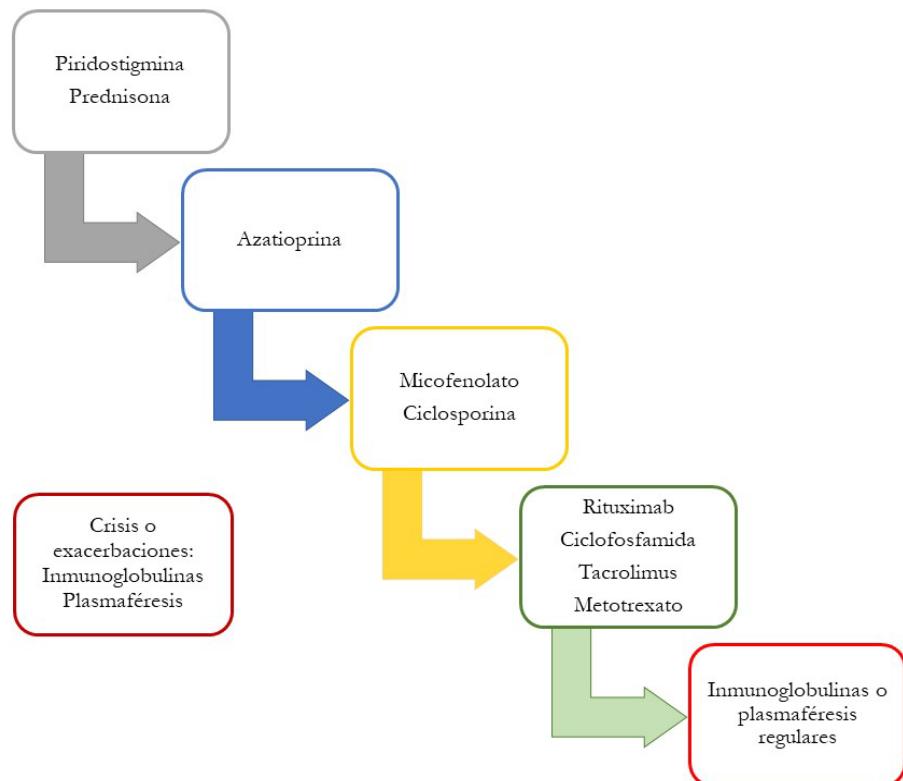


Fig. 7: Algoritmo de tratamiento en MG con anticuerpos anti-RACh.

1.7.2 Timectomía

La timectomía en pacientes sin timoma se realizaba de forma empírica hasta hace pocos años dado que no existían ensayos clínicos aleatorizados que objetivaran su eficacia. Recientemente un ensayo clínico aleatorizado concluyó que los pacientes timectomizados presentaban una mayor mejoría clínica con menores requerimientos de prednisona⁹. Por ello la timectomía se

aconseja actualmente a todo paciente con MG generalizada asociada no asociada a timoma y con anticuerpos anti-RACCh positivos menores de 65 años. Además, se debe realizar en todo paciente con timoma. El ensayo clínico publicado sobre timectomía requería que esta se realizara mediante toracotomía. En los últimos años las timectomías por vía endoscópica se está utilizando de forma creciente tanto en hiperplasia folicular como en timoma. Los estudios publicados demuestran una tasa de complicaciones menor con menor estancia hospitalaria en los pacientes intervenidos por toracoscopy si bien no existen ensayos clínicos aleatorizados que comparen directamente las dos técnicas.⁶⁹

1.8 PRONÓSTICO

En las últimas décadas las mejoras en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad han permitido reducir de forma importante la mortalidad de un 70% a menos del 5% actualmente⁷⁰. La miastenia es una enfermedad muy variable en cuanto a respuesta a tratamiento y pronóstico.

La escala MGFA-PIS es una herramienta útil para evaluar la respuesta a tratamiento de los pacientes con MG tanto en el ámbito clínico como en la investigación.

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

Fallecimiento por MG (D of MG)	Incluye complicaciones del tratamiento o en los 30 primeros días post-timectomía
--------------------------------	--

Tabla 4: Escala Myasthenia Gravis Foundation of America Post-Intervention Status (MGFA-PIS)

El objetivo terapéutico consiste en mantener al paciente en un estado de manifestaciones mínimas o remisión con el mínimo de efectos secundarios. Se considera a un paciente farmacorresistente cuando a pesar de haberse administrado tratamiento esteroideo y al menos dos inmunosupresores a dosis adecuadas no se consigue este objetivo. Alrededor de un 10-15% de los pacientes son farmacorresistentes.

Diversos estudios han intentado identificar qué factores determinan la respuesta a tratamiento con resultados discordantes. Un posible factor pronóstico sería el tipo de anticuerpos con una menor respuesta a tratamiento convencional en los pacientes con anticuerpos anti-MuSK⁷⁰ aunque con un pronóstico a largo plazo similar⁷¹.

Otro factor relacionado con un peor pronóstico es el retraso diagnóstico desde el inicio de los síntomas.⁷² La edad de inicio tardío aparece como factor de peor pronóstico en varios estudios^{72,73} sin embargo otros no encuentran diferencias significativas⁷⁴. Estas discrepancias pueden deberse a diferencias en la definición de buen pronóstico o de la edad de corte a partir de la cual se considera inicio tardío. Además, es importante diferenciar un tercer grupo diferente de la división clásica entre MG de inicio precoz y tardío que consistiría en los pacientes con MG de inicio muy tardío. Estos pacientes presentan características clínicas e inmunológicas particulares y una mejor respuesta a tratamiento⁵⁸.

Existen también discrepancias en cuanto al papel pronóstico de la patología tímica. El timoma aparece como factor de peor pronóstico en varios estudios⁷⁵⁻⁷⁷ aunque son en su mayoría estudios que sólo incluyen pacientes timectomizados lo que entraña una imposibilidad para generalizar los resultados al resto de pacientes. Los estudios que incluyen también a pacientes no timectomizados no encuentran diferencias pronósticas significativas entre pacientes con y sin timoma.^{72,78} De nuevo, la falta de criterios pronósticos homogéneos, así como la reducida muestra de pacientes con timoma de estos estudios dificultan la extracción de conclusiones fiables. Es importante además incluir como criterio de mal pronóstico la farmacorresistencia algo que no se analiza en ninguno de los estudios mencionados.

La identificación de marcadores pronósticos es clave para individualizar tratamientos. Permite reservar tratamientos más eficaces, pero con mayor potencial de efectos adversos graves a aquellos pacientes con peor pronóstico. Para identificar pacientes con peor pronóstico es necesario en primer lugar realizar una buena caracterización de los diferentes subgrupos de la enfermedad tanto a nivel fisiopatológico como clínico.

2. HIPÓTESIS

2.1 HIPÓTESIS GENERAL

La MG asociada a timoma representa un subgrupo de la enfermedad con características fisiopatológicas, clínicas y pronósticas específicas.

2.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

2.2.1 Fisiopatología de la MG asociada a timoma

- El receptor CTLA4 está implicado en la patogenia de la MG en los pacientes con timoma, existiendo una relación entre la expresión de este en el interior del timoma y el riesgo de desarrollar MG.
- Las diferencias en la expresión de CTLA4 podrían tener una base genética asociándose a diferentes polimorfismos del gen *CTLA4*.

2.2.2 Características clínicas y pronósticas de la MG asociada a timoma

- Los pacientes con MG asociada a timoma presentan diferencias epidemiológicas, inmunológicas, clínicas y pronósticas con respecto a los pacientes con MG no asociada a timoma.
- La recidiva del timoma o la persistencia de lesiones tumorales no resecables se relacionan con un peor pronóstico de la MG.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Definir las características fisiopatológicas, clínicas y pronósticas de los pacientes con miastenia gravis asociada a timoma.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Determinar la relación entre la expresión de CTLA4 en el interior del timoma con el riesgo de desarrollar MG.
- Determinar la asociación entre polimorfismos en el gen CTLA4 y la expresión de CTLA4 en el timo y el riesgo de desarrollar MG en los pacientes con timoma.
- Comparar las características clínicas de los pacientes con MG asociada a timoma con las de los pacientes con MG no asociada a timoma.
- Definir el pronóstico de la MG en los pacientes con timoma y dentro de estos de aquellos con recidiva tumoral o tumores irresecables.

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

4.1 ARTÍCULO 1

Álvarez-Velasco R, Dols-Icardo O, El Bounasri S, et al. Reduced Number of Thymoma CTLA4-Positive Cells Is Associated With a Higher Probability of Developing Myasthenia Gravis. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2023;10(2):e200085. Published 2023 Jan 25. doi:10.1212/NXI.0000000000200085

Reduced Number of Thymoma CTLA4-Positive Cells Is Associated With a Higher Probability of Developing Myasthenia Gravis

Rodrigo Álvarez-Velasco, MD, Oriol Dols-Icardo, PhD, Shaima El Bounasri, Laura López-Vilaró, Juan Carlos Trujillo, MD, David Reyes-Leiva, MD, Xavier Suárez-Calvet, PhD, Elena Cortés-Vicente, MD, PhD, Isabel Illa, MD, PhD, and Eduard Gallardo, PhD

Correspondence

Dr. Gallardo
egallardo@santpau.cat

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2023;10:e200085. doi:10.1212/NXI.0000000000200085

Abstract

Background and Objectives

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease associated with comorbid thymoma in 10%–15% of cases. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) expressed by T cells downregulates T-cell-mediated immune response. Polymorphisms in the CTLA4 gene have been associated with the development of MG. In this context, we aimed to determine whether CTLA4 expression in the thymoma differs between patients with and without MG and whether CTLA4 gene polymorphisms are associated with these differences.

Methods

This is a retrospective study of all patients, with and without MG, surgically treated at our institution for thymoma between January 2010 and December 2020. Ten samples were obtained from normal thymuses as controls. The number of CTLA4-positive cells in paraffin-embedded thymoma samples was determined by immunohistochemistry. The presence of follicular-center and regulatory T-cell lymphocytes was determined by immunohistochemistry (B-cell lymphoma [BCL]-6 expression) and double immunofluorescence-based staining of CD4-FOXP3, respectively. We evaluated the association between thymic expression of CTLA4 and the development of MG. We also determined the association between CTLA4 expression and various clinical and prognostic characteristics of MG. We sequenced the CTLA4 gene and evaluated possible associations between CTLA4 polymorphisms and thymic CTLA4 expression. Finally, we assessed the potential association between these polymorphisms and the risk of MG.

Results

Forty-one patients with thymoma were included. Of them, 23 had comorbid MG (56.1%). On average, patients with MG had fewer CTLA4-positive cells in the thymoma than non-MG patients: 69.3 cells/mm² (95% CIs: 39.6–99.1) vs 674.4 (276.0–1,024.0) cells/mm²; $p = 0.001$ and vs controls (200.74 [57.9–343.6] cells/mm²; $p = 0.02$). No between-group differences (MG vs non-MG) were observed in the number of cells positive for BCL6 or CD4-FOXP3. CTLA4 expression was not associated with differences in MG outcome or treatment refractoriness. Two polymorphisms were detected in the CTLA4 gene, rs231770 ($n = 30$ patients) and rs231775 ($n = 17$). MG was present in a similar proportion of patients for all genotypes. However, a nonsignificant trend toward a lower CTLA4-positive cell count was observed among carriers of the rs231775 polymorphism vs noncarriers: 77.9 cells/mm² (95% CI: –51.5 to 207.5) vs 343.3 cells/mm² (95% CI: 126.2–560.4).

From the Neuromuscular Diseases Unit (R.Á.-V., D.R.-L., E.C.-V., I.I.), Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; Department of Medicine (R.Á.-V., D.R.-L.), Universitat Autònoma de Barcelona; Memory Unit (O.D.-I., S.E.B.), Neurology Department and Sant Pau Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Network Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED) (O.D.-I., S.E.B.), Madrid; Departments of Pathology (L.L.-V.) and Thoracic Surgery (J.C.T.), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; Neuromuscular Diseases Group (X.S.-C., E.G.), Sant Pau Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) (E.G.), Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

Go to [Neurology.org/NN](#) for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

The Article Processing Charge was funded by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Glossary

AChR = acetylcholine receptors; BCL = B-cell lymphoma; CTLA4 = cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; EDTA = ethylene diamine tetraacetic acid; GWAS = genome-wide association study; IgG = immunoglobulin G; MG = myasthenia gravis; MGFA-PIS = MG Foundation of America postintervention status; PBS = phosphate buffer solution; Treg = T regulatory; WHO = World Health Organization.

Discussion

Reduced CTLA4 expression in thymoma may predispose to a higher risk of developing MG.

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease characterized by fatigability and weakness. In approximately 85% of cases, the disorder is associated with autoantibodies that bind to acetylcholine receptors (AChRs) in the postsynaptic membrane of the neuromuscular junction.¹

Thymomas are uncommon neoplasms derived from the epithelial cells of the thymus. Comorbid thymoma and MG is common: up to 10%–15% of patients with MG have a thymoma, and 30%–45% of patients with thymoma develop MG. The World Health Organization (WHO) classification system divides thymomas into 6 types according to epithelial cell morphology and the lymphocyte to epithelial cell ratio.² The thymomas most frequently associated with MG are those with the highest lymphocytic component (types AB, B1, and B2).³ Almost all patients with MG with thymoma have anti-AChR antibodies. Thymomas have also been associated with other autoimmune diseases, although the relationship is not as strong as with MG.⁴ The pathophysiologic mechanisms by which autoimmunity is triggered in patients with thymoma-associated MG are believed to differ from those of other MG subtypes; however, these mechanisms are not completely understood.⁵ At present, it is not clear why some patients with thymoma develop MG and others do not.⁶

Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) is a CD28 antagonistic homolog receptor expressed by T cells. When CTLA4 interacts with CD80 or CD86 on antigen-presenting cells, it exerts a downregulatory effect on T-cell-mediated immune response, thus acting as an immune checkpoint. CTLA4 is a key player in the control of self-reactive T-cell generation in the thymus. CTLA4-deficient animals experience a lymphoproliferative disorder characterized by polyclonal T-cell proliferation. Anti-CTLA4 antibodies such as ipilimumab, which is standard of care in several cancer types, have been associated with the development of a broad spectrum of autoimmune diseases, including MG.⁷

CTLA4 gene polymorphisms have been shown to predispose to several autoimmune diseases.⁸ A genome-wide association study (GWAS) conducted in a North American population with AChR antibody-positive MG found that MG was associated with the rs231770 variant of the CTLA4 gene.⁹ Another study found that the CTLA4 49A/A genotype predisposed

patients with thymoma to develop paraneoplastic MG.¹⁰ The findings of those studies suggest a potential association between CTLA4 and the development of MG. Although this association seems to be especially relevant in patients with thymoma, the underlying mechanisms are still unclear.¹¹

The major cell type expressing CTLA-4 are T regulatory (Treg) cells,¹² which are CD4⁺ cells that specifically express the FoxP3 transcription factor and play a key role in the maintenance of immunologic self-tolerance.¹³ The functional activity of Tregs seems to be inhibited in patients with MG, although the underlying molecular basis remains unknown.¹⁴

In this context, we postulate that differential expression of CTLA4 in the thymi of patients with MG would confer an increased risk of MG. We conducted this study to analyze differences in the number of CTLA4-positive thymic cells between patients with and without thymoma-associated MG. We then sought to determine whether CTLA4 polymorphisms were responsible for the differential expression of CTLA4 in T lymphocytes inside the thymoma.

Methods

Patients

The study population consisted of all consecutive patients aged 18 years or older who underwent surgery for thymoma between January 2010 and December 2020 at our center (Santa Creu i Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain). We excluded patients who underwent preoperative chemotherapy or radiotherapy and those diagnosed with thymic carcinoma. For controls, 10 normal thymi were obtained from donors without autoimmune diseases (including MG) who had undergone cardiac or parathyroid surgery.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

All patients provided informed consent. The study was approved by the Institutional Ethics Committees at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Clinical Variables

Patients with thymoma were classified into 2 subgroups according to the presence or not of comorbid MG. MG was

Table 1 Clinical Characteristics of Patients With Thymoma With and Without Associated Myasthenia Gravis

	No MG (n = 18), n (%) ^a	MG (n = 23), n (%) ^a	p Value
Sex, male	12 (66.7%)	10 (43.5%)	0.14
Mean age (SD) at thymectomy, y	66.9 (11.4)	53.4 (2.9)	0.002
Immunosuppressant treatment before thymectomy	2 (11.1%)	16 (70.0%)	<0.001
Thymoma histologic subtype (WHO)			0.003
A/AB	14 (77.8%)	7 (30.4%)	
B1/B2/B3	4 (22.2%)	16 (69.6%)	
Thymoma stage (Masaoka)			0.14
Localized (I & II)	17 (94.4%)	18 (78.3%)	
Invasive (III & IV)	1 (5.56%)	5 (21.7%)	
Other autoimmune diseases	6 (33.3%)	5 (21.7%)	0.41

Abbreviations: MG = myasthenia gravis.

^a All data are given as n (%) unless otherwise indicated.

defined as the presence of the usual symptoms of MG and a positive test for anti-AChR antibodies (>0.4 nmol/L by radioimmunoassay). All patients with thymoma were followed up preoperatively and postoperatively for a minimum period of a year by a neurologist specialized in MG. Anti-AChR antibodies and neurologic examination was performed in all patients to ensure they did not develop MG.

The following variables were recorded and assessed: demographic characteristics (sex, age at onset, and date of diagnosis); follow-up time; anti-AChR titer at thymectomy (by radioimmunoassay); distribution of muscle weakness (ocular, bulbar, or limb predominance); thymoma histology (WHO classification)²; thymoma stage (Masaoka staging system)¹⁵; frequency of myasthenic crisis; mortality and cause of death; treatment required; clinical outcome at last visit according to MG Foundation of America postintervention status (MGFA-PIS)¹⁶; and treatment refractoriness, which was defined as either unchanged or worse MGFA-PIS after treatment with corticosteroids and ≥2 other immunosuppressive agents at adequate dose levels for a sufficient duration.¹⁷

Treatment outcomes were classified as good or poor. A good outcome was defined as an MGFA-PIS score of minimal manifestations or better, which indicates an asymptomatic patient with a normal or only minimally altered physical examination. Poor outcome was defined as MGFA-PIS worse than minimal manifestations status.

Immunohistochemistry

Formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissues were routinely obtained from all surgically removed thymomas. Sections measuring 2–4 µm were collected from the thymoma tissues and processed. Samples were dewaxed, hydrated through a graded ethanol series into water, and washed in double-distilled water. Antigen retrieval was performed with

ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Goat nonimmune serum was used to block the tissue for 1 hour. The sections were incubated with the following monoclonal antibodies: mouse antihuman CTLA-4 (clone BNI3, isotype immunoglobulin G [IgG]2a, 1:100; Novus Biologicals, Minneapolis, MN), mouse antihuman B-cell lymphoma (BCL)-6 (clone GI191E, provided by Dr. Roncador CNIO, isotype IgG1, 1:350), mouse antihuman CD20 (clone L26, isotype IgG2a, nondiluted; Dako, Glostrup, Denmark), and mouse antihuman CD8 (clone C8/144 B, isotype IgG1, non-diluted; Dako). After 3 washes with phosphate buffer solution (PBS), a peroxidase-labeled goat antimouse secondary antibody was applied (1:50; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Sections were developed with DAB (3,3'-Diaminobenzidine) staining (Vector Laboratories, Burlingame, CA). To label the Treg cells, samples were permeabilized with 0.5% Tween 20 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO), and then, double immunofluorescence was performed with rabbit antihuman CD4 (clone SP35, isotype IgG, 1:50; Abcam, Cambridge, UK) and mouse antihuman FOXP3 (clone 236A, isotype IgG1, 1:10; Abcam). After 3 washes with PBS, secondary antibodies were added: goat antirabbit IgG-AlexaFluor 594

Table 2 Autoimmune Diseases Present in Patients Diagnosed With Thymoma With and Without Myasthenia Gravis

No comorbid MG (6/18)	Comorbid MG (5/23)
CIDP (n = 2)	Multiple sclerosis (n = 1)
Erythroblastopenia (n = 1)	Bone marrow aplasia (n = 1)
Goods syndrome (n = 1)	Sjögren disease (n = 1)
Aplastic anemia (n = 1)	Graves' disease (n = 1)
Bullous pemphigoid (n = 1)	Pernicious anemia (n = 1)

Abbreviations: CIDP = chronic idiopathic demyelinating polyneuropathy; MG = myasthenia gravis.

Table 3 CTLA4-Positive Cell Count in Thymomas of Patients With and Without Myasthenia Gravis, Stratified by Sex, Histologic Subtype, and Previous Immunosuppressive Treatment

	No MG, cells/mm ²	MG, cells/mm ²	p Value
Sex			
Female	888.9	83.2	0.009
Male	557.4	51.3	0.02
Thymoma histologic subtype (WHO)			
A/AB	824.9	62.5	0.03
B1/B2/B3	185.5	72.3	0.03
Patients without immunosuppressive treatment before thymectomy	649.33	48.1	0.04

Abbreviations: MG = myasthenia gravis; WHO = World Health Organization.

(Invitrogen, Waltham, MA) and goat antimouse IgG-Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

All samples were evaluated by a pathologist specialized in chest pathology. Five random fields of each tissue specimen were analyzed under $\times 10$ magnification using the Microscope Zeiss Axioskop 2 plus. Quantitative analysis of immunohistochemical staining was conducted using the image J imaging analysis software. A customized algorithm for each marker was used to determine the number of positive cells per field. The average value of the 5 fields was taken. Pathologist classifying thymomas and investigators performing immunohistologic analysis were blinded to whether the patient had MG or not.

DNA Extraction and Genotyping

Genomic DNA was extracted from EDTA-anticoagulated peripheral blood. All coding exons and rs231770 were analyzed by Sanger sequencing using the Big-Dye Terminator sequencing kit (v. 3.1, Applied Biosystems), run on an ABI 3730xl DNA analyzer, and analyzed with Sequencer software (v. 4.2; Gene Codes). Primers are listed in eTable 1, links.lww.com/NXI/A795, in supplementary material.

Statistical Analysis

Data are summarized as percentages for categorical variables and mean values with SD for continuous variables. Differences between groups were assessed with the χ^2 test for categorical variables and the 2-sided *t* test for continuous variables (or Wilcoxon test in cases of non-normal distribution). Allele and genotype frequencies were compared between groups using the Fisher exact test. We performed an receiver operating characteristic analysis to determine the best CTLA4+ cell count cutoff that allows to predict MG occurrence with optimal sensitivity and specificity. CIs of odd ratios (ORs) were calculated using the Woolf method. Pairwise deletion was used for treating missing values. All statistical analyses were performed using STATA 15.

Data Availability

The anonymized data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Results

Forty-one patients with thymoma met the inclusion criteria and agreed to participate in the study; of them, 23 (56.1%) had MG. Of the 41 patients, 22 (53.7%) were female. The mean (SD) age at thymectomy was 59.3 (14.3) years. In general, patients with MG were younger, and a higher proportion was receiving immunosuppressants, had B-type thymomas (WHO classification), and more advanced thymoma (Masaoka staging system). Table 1 summarizes the clinical characteristics of patients with and without thymoma. Eleven patients (27%) had another autoimmune disease, 6 in the non-MG group and 5 in the MG group (Table 2). No differences in the prevalence of other autoimmune diseases were observed in patients with and without MG.

CTLA4-Positive Cell Count

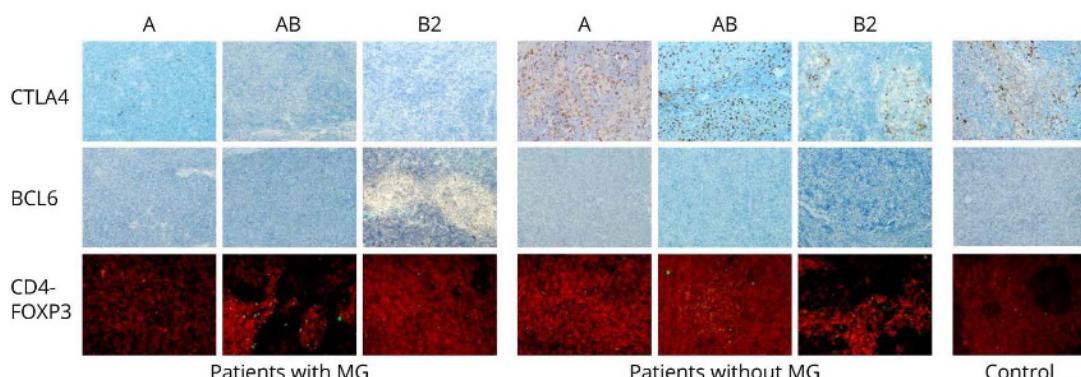
The number of thymic cells expressing CTLA4 was significantly lower in patients with MG vs those without MG, with a mean CTLA4-positive cell count of 69.3 cells/mm² (95% CI: 39.6–99.1) vs 674.4 cells/mm² (95% CI: 276.0–1,024.0), respectively ($p = 0.001$). Patients with thymoma also had fewer thymic CTLA4-positive cells than controls without thymoma (mean 1,702.7 cells/mm² [95% CI: 1,062.6–2,340.7]; $p = 0.01$). CTLA4 was more frequently expressed by medullar than cortical lymphocytes of control thymuses (3,330.0 cells/mm²

Table 4 Differences in the Number of CD4⁺, CD4-FOXP3⁺ and BCL6⁺ Cells in the Thymomas of Patients With and Without Associated Myasthenia Gravis

	No MG		
	Cells/mm ² (95% CI)	MG	p Value
Total CD4 ⁺ cells	245.1 (221.1–269.1)	252.7 (213.0–292.5)	0.75
CD4-FOXP3 ⁺ cells	556.3 (185.1–927.6)	556.3 (350.2–762.5)	1
BCL6 ⁺ cells	107.82 (6.80–208.8)	498.94 (0–1,328.6)	0.38

Abbreviations: MG = myasthenia gravis.

Figure 1 Thymoma Sections of A, AB, and B2 Thymomas of 3 Patients With Myasthenia Gravis (MG), 3 Patients Without MG, and 1 Normal Thymus



Sections were processed for CTLA4 and BCL6 by immunohistochemistry and FOXP3 (green)-CD4 (red) using double immunofluorescence ($\times 10$ magnification). CTLA4 = Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.

[95% CI: 2,434.7–4,224.3] vs 761.6 [95% CI: 418.5–1,104.8]; $p = 0.02$). No differences in CTLA4-positive cell counts were observed between patients with thymoma who presented with comorbid autoimmune disease (other than MG) and patients without any comorbid autoimmune disease, which are as follows: 660.1 cells/mm² (95% CI: 182.1–1,138.0) vs 708.9 cells/mm² (95% CI: 90.8–1,279.0) ($p = 0.9$).

Stratified by sex, thymoma histologic subtype, and previous immunosuppressive treatment, the differences in the number of cells expressing CTLA4 between patients with and without MG remained significant (Table 3).

We performed a receiver operating characteristic analysis to assess the validity of the CTLA4-positive cell count to predict MG occurrence in patients with thymoma. We obtained an area under the curve of 0.85 (95% CI: 0.71–0.94) and a value of 170 cells/mm² below which MG occurs with Se of 87% and Sp of 78%.

No association was observed between the number of CTLA4-positive cells and the number of either CD4-FOXP3-positive or BCL6-positive cells ($r^2 = 0.011$ and $r^2 = 0.0015$, respectively). Similarly, no differences in the number of positive CD4, CD4-FOXP3, or BCL6 cells were observed between patients with and without MG (Table 4). Figure 1 shows examples of CTLA4, BCL6, and CD4-FOXP3 expression in the thymomas of patients with and without MG.

No association was found between CTLA4-positive cell count and anti-AChR antibody titers in patients with MG during thymectomy ($r^2 = 0.042$). No association was found between CTLA4-positive cell count and MG outcomes (MGFA-PIS) at 1 year post-thymectomy or at the final follow-up. At 1 year, patients with a good outcome had a mean of 52.8 cells/mm² (95% CI: 12–93.52) vs 78.4 (95% CI: 28.83–127.9) in patients with a poor outcome ($p = 0.38$). At the final follow-up,

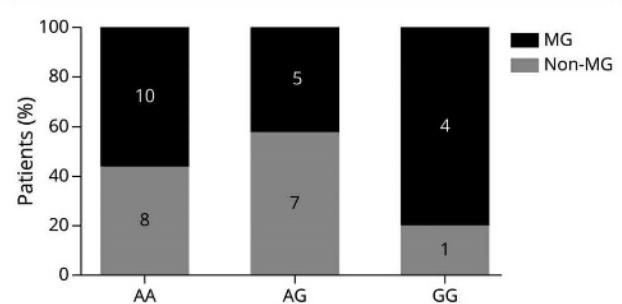
the corresponding values were 69.2 (95% CI: 24.40–114) vs 69.5 (95% CI: 22.81–116.22), $p = 0.99$. No association was detected between CTLA4-positive cell count and treatment refractoriness in patients with MG, which are as follows: no treatment vs treatment refractoriness: 62.54 cells/mm² (95% CI: 29.13–95.96) vs 101.61 (95% CI: 0–205.39), $p = 0.31$.

CTLA4 Gene Sequencing

We genotyped all coding exons and the single nucleotide polymorphism rs231770 in a noncoding region in patients with thymoma with ($n = 19$) and without ($n = 16$) associated MG.

The rs231770 polymorphism was present in 30 of these 35 patients (85.7%), and a second polymorphism, rs231775, was present in 17 of these patients (48.6%). The genotype distribution of CTLA4 polymorphisms in patients with thymoma with and without MG was in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). In patients with thymoma, the prevalence of paraneoplastic MG did not differ significantly

Figure 2 Prevalence of Paraneoplastic Myasthenia Gravis (MG) in Patients With Thymoma With Different CTLA4 rs231775 Genotypes



CTLA4 = Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.

Table 5 Differences in the Prevalence of Myasthenia Gravis Between Patients With Thymoma According to CTLA4 rs231770 Genotypes and Alleles

rs231770	MG (+) thymoma (n = 19)	MG (−) thymoma (n = 16)	OR (95% CI)	p Value
Genotype				
TT	3 (60%)	2 (40%)	1.31 (0.13–17.7)	0.78
TC	6 (43%)	8 (57%)	0.46 (0.09–2.23)	0.27
CC	10 (63%)	6 (37%)	1.85 (0.40–8.93)	0.37
Allele				
T	12 (50%)	12 (50%)	0.77 (0.29–2.07)	0.60
C	26 (57%)	20 (43%)	1.3 (0.48–3.50)	

Abbreviations: MG = myasthenia gravis; OR = odds ratio.

among the 3 rs231770 genotypes. In addition, no differences in the prevalence of MG were found among patients with the 3 rs231775 genotypes. However, a trend toward a higher prevalence of MG was found in patients with the G/G genotype compared with those with the A/A or A/G phenotype (OR: 4; 95% CI: 0.4–40.1). See Figure 2 and Tables 5 and 6.

None of the polymorphisms were associated with differences in the number of CTLA4-positive cells within the thymoma, although a trend was observed in patients carrying the rs231775 variant toward a lower cell count compared with noncarriers: 77.9 cells/mm² (95% CI: –51.5 to 207.5) vs 343.3 cells/mm² (95% CI: 126.2–560.4).

Discussion

In this study, the number of thymoma cells expressing CTLA4 were markedly reduced in patients with MG compared with those without MG (69.3 vs 674.4 cells/mm², *p* = 0.001), and these differences were independent of sex, age, histologic subtype, and previous immunosuppressive treatment. None

of the CTLA4 gene polymorphisms were associated with a higher probability of developing MG nor with a difference in the number of CTLA4-positive cells in the thymoma. However, carriers of the rs231775 variant showed a trend toward lower CTLA4 expression. CTLA4 is constitutively expressed by Treg cells and after T-cell receptor-mediated activation in a subset of CD4⁺ helper T cells. However, in contrast to previous reports,¹⁸ the number of Treg cells did not differ between patients with and without MG, suggesting that the lower number of CTLA4-positive cells in patients with MG is due to the reduced expression of the protein and not to a decrease in the number of Treg cells. We hypothesize that a dysfunction of Treg lymphocytes that would lead to a lower expression of CTLA4 in some patients with thymoma would confer an increased risk of developing MG. Indeed, an inducible deletion of CTLA-4 on Tfr cells results in decreased suppressive function *in vitro* and *in vivo*.¹⁹

We found a higher expression of CTLA4 in the medulla of control thymuses compared with that in the cortex. Likewise, we found a higher expression of CTLA4 in type A/AB thymomas (medullary or mixed component) compared with that

Table 6 Differences in the Prevalence of Myasthenia Gravis Between Patients With Thymoma With Different CTLA4 rs231775 Genotypes and Alleles

rs231775	MG (+) thymoma (n = 19)	MG (−) thymoma (n = 16)	OR (95% CI)	p Value
Genotype				
AA	10 (56%)	8 (44%)	1.1 (0.29–4.20)	1
AG	5 (42%)	7 (58%)	0.46 (0.11–1.9)	0.23
GG	4 (80%)	1 (20%)	4 (0.4–40.1)	0.23
Allele				
A	25 (52%)	23 (48%)	0.75 (0.27–2.1)	0.58
G	13 (59%)	9 (41%)	1.33 (0.48–3.69)	

Abbreviations: GG = guanine guanine; MG = myasthenia gravis; OR = odds ratio.

in type B thymomas (cortical component) of patients without MG. However, this finding is not replicated in patients MG in whom the expression of CTLA4-positive cells is equally low in both histologic subtypes. In the stratified study, the differences between CTLA4 cells between patients with and without MG remain significant regardless of the histologic subtype.

CTLA4 knock out results in increased T helper differentiation, increased germinal center B cells, and higher serum immunoglobulin levels in mice.¹⁹ We did not find any differences in the number of follicular center cells (BCL6-positive cells) in the thymomas of patients with and without MG. Similarly, we found no association between the number of CTLA4-positive cells and the number of follicular cells. Although the thymus is considered the site of induction for loss of self-tolerance in patients with MG, altered peripheral immunoregulatory mechanisms such as defective immunosuppressive function of Tregs may help to maintain the AChR-specific autoimmune response. In this regard, it would be valuable to conduct a study to evaluate CTLA4 and BCL6 expression at the periphery to better understand the role of CTLA4 in the pathogenesis of thymoma-associated MG.

A previous study shows an increase in germinal center number in adjacent thymic tissue but not in the thymomas of patients with thymoma-associated MG compared with nonmyasthenic thymoma patients.²⁰ In addition, recently, Song et al.²¹ demonstrated that thymoma-associated patients with MG have a higher percentage of BCL6-positive cells in adjacent thymic tissue around thymoma than non-MG thymoma patients or controls. Because we analyzed exclusively thymoma tissue and not adjacent tissues, this could explain the lack of differences in BCL6 expression between patients with and without MG.

Our data show that the number of thymic CTLA4-positive cells does not seem to influence MG prognosis. However, given the small sample size of our study, we cannot rule out this potential association. In addition, several different factors—such as age, immunosuppressive treatment, and/or histologic subtype—can act as confounders between the number of CTLA4-positive cells and prognosis.

Patients with loss-of-function mutations in the CTLA4 gene develop inflammatory lesions containing activated T cells and macrophages affecting multiple organs. Polymorphisms in the CTLA4 gene are also associated with several autoimmune diseases in humans.²² After a complete sequencing of all CTLA4 coding regions, we found the presence of a previously described polymorphism (rs231775) in exon 1 of the CTLA4 gene in a significant proportion of the patients. This A/G polymorphism at position +49 results in an amino acid change (p.Thr17Ala) in the leader sequence. The rs231775 polymorphism leads to inefficient processing in the endoplasmic reticulum, a differential glycosylation pattern, and decreased trafficking to the cell surface of CTLA4.²³ The guanine guanine (GG) genotype in the CTLA4 rs231775 polymorphism has been associated with an increased risk of several conditions, including Graves' disease,

primary biliary cirrhosis,²⁴ type 1 diabetes,²⁵ and other autoimmune diseases. A previous study found that the GG genotype was unexpectedly protective against paraneoplastic MG in patients with thymoma, in contrast to the significant association between this genotype and all other non-MG autoimmune diseases.¹⁰ We also sequenced the rs231770 polymorphism, which was associated with MG in a GWAS involving 1,032 patients with MG in North America.⁹ Another study found that this polymorphism was associated with a lower expression of CTLA4.²⁶

Although we found no increased risk of developing MG in patients carrying the rs231770 or rs231775 polymorphisms, we did observe a trend toward a higher risk in patients with the +49 GG genotype. However, this genotype was not associated with the number of CTLA+ cells, although the lack of statistical association could be due to an insufficient sample size. In addition, other variants (apart from those evaluated in this study) in the noncoding region of the CTLA4 gene could also be implicated in the lower number of CTLA4+ cells in the thymomas of patients with MG. Finally, nongenetic factors could also explain these differences, with a lower CTLA4 expression in patients with MG being an epiphenomenon and not the primary cause of the loss of immune self-tolerance.

A better understanding of the mechanisms by which autoimmunity is triggered in patients with MG is essential to develop specific therapies designed to minimize or even prevent the frequent side effects of current immunosuppressants. Confirmation of CTLA4 involvement in MG would represent a potential new therapeutic target.

In conclusion, in this study, the thymomas of patients with MG had fewer CTLA4-positive cells than those without MG. However, no clear association was found between CTLA4 gene polymorphisms and the number of positive cells or the development of MG in patients with thymoma. Larger studies are warranted to clarify this potential association.

Acknowledgment

D. Reyes-Leiva, X. Suárez-Calvet, E. Cortés-Vicente and Eduard Gallardo are members of the European Reference Network for Neuromuscular Diseases (EURO-NMD), including CSUR (a national reference center for rare neuromuscular diseases), and XUECs (Networks of Specialized Centers of Excellence in Minority Health). Coauthor Professor Isabel Illa, MD, PhD, passed away on March 20, 2022.

Study Funding

This work was funded by the "Instituto de Salud Carlos III" through project PI19/01,774 (cofunded by the European Union ERDF), PI I. Illa, and E. Gallardo. E. Cortés-Vicente was supported by a "Juan Rodés" grant (JR19/00,037) from the "Fondo de Investigación en Salud, Instituto de Salud Carlos III" and cofunded by the European Union (ERDF/ESF, "A way to make Europe"/"Investing in your future"), Ministry of Health (Spain).

Disclosure

The authors report no disclosures relevant to the manuscript.
Go to Neurology.org/NN for full disclosure.

Publication History

Received by *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* September 7, 2022. Accepted in final form November 23, 2022. Submitted and externally peer reviewed. The handling editor was Associate Editor Marinos C. Dalakas, MD, FAAN.

Appendix Authors

Name	Location	Contribution
Rodrigo Alvarez-Velasco, MD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain	Drafting/revision of the article for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data
Oriol Dols-Icardo, PhD	Memory Unit, Neurology Department and Sant Pau Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Network Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain	Drafting/revision of the article for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
Shaima El Bounasri	Memory Unit, Neurology Department and Sant Pau Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Network Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain	Major role in the acquisition of data
Laura López-Vilaró	Department of Pathology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain	Drafting/revision of the article for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; and analysis or interpretation of data
Juan Carlos Trujillo, MD	Department of Thoracic Surgery, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain	Major role in the acquisition of data
David Reyes-Leiva, MD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain	Major role in the acquisition of data; analysis or interpretation of data
Xavier Suárez-Calvet, PhD	Neuromuscular Diseases Group, Sant Pau Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain	Study concept or design

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
Elena Cortés-Vicente, MD, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain	Drafting/revision of the article for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data
Isabel Illa, MD, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain	Drafting/revision of the article for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data
Eduard Gallardo, PhD	Neuromuscular Diseases Group, Sant Pau Biomedical Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain	Drafting/revision of the article for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; and analysis or interpretation of data

References

1. Gilhus NE, Verschueren JJ. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol*. 2015;14(10):1023-1036. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00145-3.
2. Rosai J, Sobin LH. *Histological Typing of Tumours of the Thymus*: Springer Berlin Heidelberg; 1999. doi: 10.1007/978-3-642-60157-6.
3. Shen J, Tie H, Xu A, et al. Inter-relationship among myasthenia gravis, WHO histology, and Masaoka clinical stage and effect on surgical methods in patients with thymoma: a retrospective cohort study. *J Thorac Dis*. 2018;10(5):2981-2990. doi: 10.21037/jtd.2018.05.30.
4. Bernard C, Früh F, Pasquet F, et al. Thymoma associated with autoimmune diseases: 85 cases and literature review. *Autoimmun Rev*. 2016;15(1):82-92. doi: 10.1016/j.autrev.2015.09.005.
5. Marx A, Pfister F, Schalke B, Saruhan-Direskeneli G, Melms A, Ströbel P. The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):875-884. doi: 10.1016/j.autrev.2013.03.007.
6. Cetin H, Vincent A. Pathogenic mechanisms and clinical correlations in autoimmune myasthenic syndromes. *Semin Neurol*. 2018;38(03):344-354. doi: 10.1055/s-0038-1660500.
7. Safa H, Johnson DH, Trinh VA, et al. Immune checkpoint inhibitor related myasthenia gravis: single center experience and systematic review of the literature. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):319. doi: 10.1186/s40425-019-0774-y.
8. Gough SCL, Walker LSK, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2005;204(1):102-115. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00249.x.
9. Renton AE, Phner HA, Provenzano C, et al. A genome-wide association study of myasthenia gravis. *JAMA Neurol*. 2015;72(4):396. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.4103.
10. Chuang W-Y, Ströbel P, Gold R, et al. A CTLA4high genotype is associated with myasthenia gravis in thymoma patients. *Ann Neurol*. 2005;58(4):644-648. doi: 10.1002/ana.20577.
11. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Cta-4. *Science*. 1995;270(5238):985-988. doi: 10.1126/science.270.5238.985.
12. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by Cd25+Cd4+Regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192(2):303-310. doi: 10.1084/jem.192.2.303.
13. Richards DM, Delacher M, Goldfarb Y, et al. Treg cell differentiation: from thymus to peripheral tissue. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol 136. 1st ed. Elsevier Inc; 2015:175-205. doi: 10.1016/bs.pmtbs.2015.07.014.
14. Zhang Y, Wang Hb, Chi Lj, Wang Wz. The role of FoxP3+CD4+CD25hi Tregs in the pathogenesis of myasthenia gravis. *Immunol Lett*. 2009;122(1):52-57. doi: 10.1016/j.imlet.2008.11.015.

15. Masaoka A, Monden Y, Nakahara K, Tanioka T. Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer*. 1981;48:24852-32492. doi: 10.1002/1097-0142(19811201)48:11<2485.
16. Jaretzki A, Barohn RJ, Ernstoff RM, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task force of the medical scientific advisory board of the myasthenia gravis foundation of America. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(1):327-334. doi: 10.1016/s0003-4975(00)01595-2.
17. Sanders DB, Wolfe GI, Benatar M, et al. International consensus guidance for management of myasthenia gravis. *Neurology*. 2016;87(4):419-425. doi: 10.1212/wnl.0000000000002790.
18. Strobel P, Rosenwald A, Beyersdorf N, et al. Selective loss of regulatory T cells in thymomas. *Ann Neurol*. 2004;56(6):901-904. doi: 10.1002/ana.20340.
19. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T_{regulatory} cells. *Immunity*. 2014;41(6):1026-1039. doi: 10.1016/j.jimmuni.2014.12.005.
20. Lefevre CM, Payet CA, Fayet O-M, et al. Risk factors associated with myasthenia gravis in thymoma patients: the potential role of thymic germinal centers. *J Autoimmun*. 2020;106(August):102337. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102337.
21. Song Y, Zhou L, Miao F, et al. Increased frequency of thymic T follicular helper cells in myasthenia gravis patients with thymoma. *J Thorac Dis*. 2016;8(3):314-322. doi: 10.21037/jtd.2016.03.03.
22. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet*. 2005;77(6):1044-1060. doi: 10.1086/498651.
23. Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier M-C, Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46478-46486. doi: 10.1074/jbc.M206894200.
24. Juran BD, Atkinson EJ, Schlicht EM, Fridley BL, Lazaridis KN. Primary biliary cirrhosis is associated with a genetic variant in the 3' flanking region of the CTLA4 gene. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1200-1206. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.077.
25. Qu H-Q, Bradfield JP, Grant SFA, Hakonarson H, Polychronakos C and the Type I Diabetes Genetics Consortium. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes Immun*. 2009;10(S1):S27-S32. doi: 10.1038/geno.2009.88.
26. Handunnetthi L, Knezevic B, Kasela S, et al. Genomic insights into myasthenia gravis identify distinct immunological mechanisms in early and late onset disease. *Ann Neurol*. 2021;90(3):455-463. doi: 10.1002/ana.26169.

Supplementary table: Primers employed to identify genetic variants in *CTLA4*.

Region	Forward Primer	Reverse Primer
Exon 1	AAGTCCTTGATTCTGTGTGGG	ATCACTGCCTTGACTGCTG
Exon 2	CCATGAAGGAGCATGAGTTC	ACTGCAATGCAACAGGTGTC
Exon 3	GGCTACCCATGCAATTAGG	TGCCAGTTGATACCACTAAAG
Exon 4	ATGGTTAGAAGTGGCTTCCG	AGAATTGCCTCAGCTCTTGG
rs231770	TCAAGTAATCTGTGGGTGG	AAAATGTCACAGGCCAAGC

eTable 1. Sequence of each pair of primers used to sequence the four coding exons of *CTLA4* and rs231770 genetic variant.

4.2 ARTÍCULO 2

Álvarez-Velasco R, Gutiérrez-Gutiérrez G, Trujillo JC, et al. Clinical characteristics and outcomes of thymoma-associated myasthenia gravis. Eur J Neurol. 2021;28(6):2083-2091.
doi:10.1111/ene.14820

doi: 10.1111/ene.14820

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ene.14820>

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

La MG es una enfermedad heterogénea motivo por el cual se clasifica a los pacientes en subtipos fisiopatológicos, inmunológicos, epidemiológicos y clínicos. Describir adecuadamente los diferentes subtipos de la enfermedad permite conocer mejor el origen de las diferencias en el pronóstico de los pacientes. El objetivo principal de esta tesis es describir clínica y fisiopatológicamente a los pacientes con miastenia gravis asociada a timoma.

La fisiopatología de la MG asociada a timoma es diferente y menos conocida que la de la MG no asociada a timoma. En el interior del timoma existe una desregulación entre la función activadora de los linfocitos T efectores y la inhibidora de los T reguladores.^{37,79} Sin embargo, se desconoce la causa inicial de esta desregulación. Un posible candidato implicado en los procesos iniciales que desencadenan la autoinmunidad en los pacientes con MG asociada a timoma es el CTLA4, un receptor principalmente expresado en la superficie de los linfocitos T reguladores con papel inmunomodulador. Varios polimorfismos en el gen *CTLA4* se han relacionado con una mayor probabilidad de desarrollar MG en los pacientes con timoma.^{50,51} Sin embargo, se desconoce si el riesgo de desarrollar MG asociado con estos polimorfismos se debe a una expresión diferencial de CTLA4 a nivel tímico.

El objetivo de nuestro estudio expuesto en el artículo 1 fue analizar la asociación entre polimorfismos en el gen *CTLA4*, la expresión de CTLA4 a nivel tímico y el riesgo de desarrollar MG. Para ello utilizamos las muestras de timoma de 41 pacientes timectomizados con o sin MG asociada conservadas en parafina en nuestro centro. Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para CTLA4, BCL6 (para marcar centros germinales) y doble tinción inmunofluorescente CD4-FOXP3 (para marcar linfocitos Treg). Comparamos el número de células positivas para los diferentes marcadores entre los pacientes con y sin MG. Además, analizamos la relación entre la expresión de CTLA4 en el timo con la cantidad de linfocitos T reguladores, la presencia de centros germinales, así como con diferentes características clínicas y pronósticas de la MG. Finalmente, secuenciamos el gen *CTLA4* y medimos la asociación de los diferentes polimorfismos encontrados con la expresión de CTLA4 y con la probabilidad de desarrollar MG.

De los 41 pacientes con timoma 23 (56,1%) tenían MG. Los pacientes con MG fueron más jóvenes (53,4 Vs 66,9 años p=0,002), recibieron más frecuentemente inmunosupresores previos a la timectomía [16 (70,0%) Vs 2 (11,1%) p<0,001], tuvieron más frecuentemente timomas de tipo B según la clasificación histológica de la OMS [16 (69,6%) Vs 4 (22,2%) p=0,003] así como mayor prevalencia de timomas invasivos [5 (21,7%) Vs. 1 (5,56%)]. 26 de

los 41 pacientes tenían otra enfermedad autoinmune diferente a la MG sin diferencias entre el grupo de pacientes con y sin MG (5 en el grupo con MG, 6 en el grupo sin MG).

Los pacientes con timoma y MG presentaron un menor número de células CTLA4 positivas en el timo en comparación con los pacientes con timoma sin MG: 69,3 cells/mm² (IC 95%: 39,6–99,1) vs 674,4 cells/mm² (IC 95%: 276,0–1024,0), p=0,001. Estas diferencias fueron independientes del sexo, edad, subtipo histológico del timoma y tratamiento inmunosupresor previo a la timectomía. Mediante un análisis ROC encontramos como valor óptimo de sensibilidad y especificidad 170 cel/mm², valor por debajo del cual se produce MG con una sensibilidad del 87% y una especificidad del 78%. No encontramos diferencias en el número de células CTLA4 positivas entre los pacientes con otra enfermedad autoinmune asociada (diferente a MG) y los pacientes sin ninguna enfermedad autoinmune asociada: 660,1 cels/mm² (IC 95%: 182,1–1138,0) vs 708,9 cells/mm² (IC 95%: 90,8–1279,0), p = 0.9. Encontramos una mayor cantidad de células CTLA4 positivas a nivel medular que cortical: 3330,0 (IC 95%: 2,434.7–4,224.3) Vs 761,7 (IC 95%: 418,5–1104,8) p=0,002. No encontramos diferencias significativas en cuanto a número de linfocitos reguladores tímicos (aquellos que expresan CTLA4 de forma predominante) entre los pacientes con timoma con y sin MG: sin MG 245,1 cel/mm² (IC 95%: 221,1–269,1); con MG 252,7 cel/mm² (IC 95%: 213,0–292,5); p=0.75. Tampoco encontramos diferencias significativas en el número de linfocitos activados de los centros germinales (marcados con BCL6): sin MG 107,82 cel/mm² (IC 95%: 6,80–208,8) con MG 498,94 cel/mm² (IC 95%: 0–1328,6); p=0.38. No encontramos asociación entre el número de células CTLA4 positivas y el título de anticuerpos anti-RACH, la respuesta a tratamiento medida mediante la escala MGFA-PIS a un año tras la timectomía o al final del seguimiento ni la farmacorresistencia.

En nuestra serie encontramos dos polimorfismos en el gen *CTLA4*: rs231770 y rs231775. El polimorfismo rs231775 se relacionó con una mayor tendencia a desarrollar MG en los pacientes con timoma, encontrándose el genotipo CC en el 63% de los pacientes con MG y en el 37% de aquellos sin MG. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa. Este polimorfismo se asoció también con una expresión menor de CTLA4 en el timo, aunque esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa (77.9 cels/mm² (IC 95% –51.5-207.5) vs 343.3 cells/mm² (IC 95%: 126.2–560.4).

Además de unos mecanismos fisiopatológicos específicos, los pacientes con MG asociada a timoma también presentan una características clínicas y pronósticas específicas. Sin embargo, el conocimiento que tenemos sobre este tipo de pacientes se basa en series pequeñas y con resultados discordantes.^{72,75,76,80,81} El objetivo del estudio presentado en nuestro segundo

artículo es describir las características clínicas de los pacientes con MG asociada a timoma comparándolas con aquellas del resto de pacientes con MG asociada a anticuerpos anti-RCh. Además, nos propusimos determinar si la recidiva del timoma o la presencia de lesiones irresecables se asociaba con un peor pronóstico de la MG. Para ello utilizamos el Registro Español de Enfermedades Neuromusculares llevado a cabo desde 2010 por expertos en patología neuromuscular de 30 centros nacionales.

De los 964 pacientes con MG asociada a anticuerpos anti-RCh incluidos, 148 (15,4%) presentaban timoma. El tiempo medio de seguimiento de estos pacientes fue de 4,6 años (rango 1-28,2). En comparación con los pacientes miasténicos sin timoma, los pacientes con timoma de nuestra serie fueron más jóvenes (52,0 vs. 60,4 años; $p<0,001$) y presentaron formas más graves de la MG según la clasificación MGFA al inicio de la enfermedad (OR: 1,6; IC 95%: 1,15-2,21; $p=0,005$) y en el momento de mayor gravedad de la enfermedad (OR: 2,54; IC 95%: 1,85-3,48; $p<0,001$). Tras corregir por diferentes factores de confusión, encontramos que los pacientes con timoma presentaron peor respuesta a tratamiento medida con la escala MGFA-PIS tras 1 y 5 años del diagnóstico (OR 1 año: 3,05; IC 95%: 1,56–5,93; $p=0,001$; OR 5 años: 6,31; IC 95%: 3,13–12,73; $p<0,001$) así como mayor probabilidad de farmacorresistencia (OR: 2,28; IC 95%: 1,18–2,61; $p=0,005$), mayor probabilidad de presentar crisis miasténicas (OR: 2,97; IC 95%: 1,83–4,80; $p < 0,001$) y mayor tasa de mortalidad (HR: 2,46; IC 95%: 1,47–4,14; $p=0,001$). 28 pacientes (18,9%) fallecieron durante el seguimiento en el grupo de pacientes con timoma. La primera causa de muerte en este grupo fue la diseminación y recurrencia del timoma (8 pacientes), siendo la MG una causa de muerte rara (1 paciente). No encontramos asociación entre el subtipo histológico ni el estadío del timoma y el pronóstico de la MG.

De los 148 pacientes con timoma se produjo recurrencia de este una vez realizada timectomía con o sin radioterapia y quimioterapia acompañantes en 27 (18,1%) pacientes. La recurrencia del timoma coincidió con un empeoramiento de la MG en la mitad de los casos (13/27), pero sin diferencias en el pronóstico a largo plazo determinado mediante escala MGFA-PIS al final del seguimiento, farmacorresistencia y mortalidad. Quince pacientes presentaron restos tumorales tras el tratamiento completo. Estos pacientes presentaron un peor pronóstico de la MG. 8 de ellos fallecieron por complicaciones derivadas del crecimiento tumoral. Solo 3 de los pacientes presentaron un control adecuado de los síntomas miasténicos al final del seguimiento determinado mediante un estado de Mínimas Manifestaciones o mejor en la escala MGFA-PIS.

En resumen, en esta tesis hemos descrito un biomarcador, el CTLA4, asociado con el riesgo de desarrollar MG en los pacientes con timoma. El CTLA4 se encontró expresado en menor cantidad en el timo de los pacientes con timoma que desarrollaron MG en comparación con aquellos que no desarrollaron esta enfermedad. Sin embargo, no pudimos demostrar que estas diferencias se debieran a polimorfismos del gen *CTLA4*. Por otra parte, encontramos que los pacientes con MG asociada a timoma presentaban formas más graves de la enfermedad, con peor respuesta a tratamiento y mayor mortalidad. Además, aquellos que presentaron recidivas del timoma asociaban frecuentemente empeoramiento de los síntomas miasténicos y aquellos con lesiones no resecables generalmente presentaban una mala evolución de la MG, así como una elevada mortalidad.

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

En esta tesis nos propusimos caracterizar mejor al subgrupo de pacientes con MG asociada a timoma. Para ello, en la primera parte de nuestro trabajo, recogida en el artículo 1, estudiamos los mecanismos fisiopatológicos potencialmente implicados en el desarrollo de MG en los pacientes con timoma. Los mecanismos por los que unos pacientes con timoma desarrollan miastenia gravis y otros no son desconocidos. Diversos estudios apuntan a que los linfocitos Treg cuya función es inmunomoduladora tendrían un papel destacado en la fisiopatogenia de la enfermedad. La mayoría de los estudios no encuentran diferencias cuantitativas en el número de Treg en el timo o en sangre periférica entre pacientes con y sin MG²⁷ pero sí diferencias cualitativas de estos linfocitos con una capacidad menor para suprimir los mecanismos de autoinmunidad.^{25,26,82} De la misma manera, en nuestro estudio no hemos detectado diferencias en el número de Treg en los timomas de pacientes con y sin MG pero sí una menor cantidad de células que expresan CTLA4. Este receptor se expresa principalmente en la superficie de los Treg. Podemos por lo tanto plantear la hipótesis de que esta disfunción de los Treg sea al menos parcialmente debida a una menor expresión de CTLA4.

Una menor expresión de CTLA4 produciría una menor capacidad inmunomoduladora de los Treg lo que permitiría que clones autorreactivos de linfocitos B productores de anticuerpos anti-RACh escapasen a los mecanismos de control inmunológico. En efecto, la delección de *CTLA4* en ratón produce una disfunción de los linfocitos Treg con falta de supresión de la respuesta inmune de células B en los centros germinales así como un aumento de producción de inmunoglobulinas.⁸³ Para comprobar si en nuestros pacientes la reducción de CTLA4 se relacionaba con una mayor presencia de linfocitos B activos utilizamos el marcador BCL6 que caracteriza a los linfocitos activados de los centros germinales. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre el número de células BCL6+ en los timomas de pacientes con y sin MG ni relación entre el número de células CTLA4+ y BCL6+. Existe la posibilidad de que esta activación se produzca en la grasa peritímica que rodea al timoma como apuntan estudios previos⁸⁴ y por lo tanto al no disponer de suficiente tejido peritímico en las muestras utilizadas no veamos diferencias en el número de linfocitos B activados.

Como se ha comentado en la introducción, varios polimorfismos en el gen *CTLA4* implicados en una menor expresión celular del receptor se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar MG. Nos planteamos por lo tanto la posibilidad de que las diferencias encontradas en el número de células CTLA4+ entre los pacientes con y sin MG fueran

secundarias a polimorfismos genéticos. Encontramos la presencia de una variante previamente descrita (rs231775) en el exón 1 del gen *CTLA4*. Este polimorfismo A/G en la posición +49 da como resultado un cambio de aminoácidos (p.Thr17Ala) que produce un procesamiento ineficaz de la proteína en el retículo endoplásmico con un patrón de glicosilación diferencial y una disminución del tráfico hacia la superficie celular.⁸⁵ El genotipo GG se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedad de Graves⁴⁹, cirrosis biliar primaria⁸⁶, diabetes tipo 1⁸⁷ y otras enfermedades autoinmunes. Inesperadamente, este genotipo ha sido descrito como protector para MG en pacientes con timoma en oposición a la asociación encontrada en todas las demás enfermedades autoinmunes.⁵¹ En nuestro estudio, encontramos una mayor proporción de pacientes con el genotipo GG que desarrollaron MG que en el grupo de pacientes con genotipo AA y AG aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Sólo 5 pacientes en nuestra muestra tenían el genotipo GG lo que puede explicar la falta de potencia estadística.

En el segundo artículo nos propusimos caracterizar clínicamente al subgrupo de pacientes con MG asociada a timoma comparándoles con un grupo de pacientes con MG sin timoma. Encontramos varias diferencias significativas:

Los pacientes con timoma fueron más jóvenes al inicio de la MG que el resto. Los estudios epidemiológicos iniciales encontraban que la MG empezaba más tarde en los pacientes con timoma en comparación con el resto de pacientes miasténicos.⁸⁸ Nuestra muestra se asemeja más a los resultados aportados por estudios más recientes⁸⁹ en los que la edad de inicio de la MG es anterior en los pacientes con timoma. Una explicación para este hallazgo podría ser la elevada edad media de inicio en los pacientes de nuestra muestra (60,4 años) en probable relación con el hecho de que la edad de inicio de la enfermedad esté aumentando a lo largo de los años⁵⁶⁻⁵⁸ mientras que la edad de inicio de la MG asociada a timoma se mantiene estable (en torno a los 50 años).

Los pacientes con timoma presentaron formas más graves de la MG tanto al inicio como a lo largo de la evolución y mayor probabilidad de presentar una crisis miasténica. Es llamativo que el tiempo medio transcurrido desde la timectomía hasta la primera crisis miasténica fue de más de 3 años en los pacientes con timoma lo que indica que la mayor gravedad de la MG asociada a timoma se mantiene a largo plazo a pesar de la timectomía. Esto concuerda con la observación de que la timectomía es menos eficaz a la hora de mejorar los síntomas de la MG en los pacientes con timoma que en los pacientes con hiperplasia tímica.⁷⁷ Como hemos comentado previamente, es posible que estén implicados fenómenos de autoinmunidad a

nivel periférico que perpetúen la producción de autoanticuerpos incluso después de la timectomía. Por otra parte, encontramos mayor mortalidad por cualquier causa en el grupo de pacientes con timoma, aunque las principales causas de muerte en este grupo fueron el crecimiento del propio timoma y la infecciones siendo raras las muertes por MG.

Los pacientes con MG asociada a timoma presentaron mayor tasa de farmacorresistencia. Esto representa un hallazgo novedoso ya que ninguno de los estudios previos analizaba esta variable en un número suficiente de pacientes con timoma. La MG es una enfermedad con una gran variedad de opciones terapéuticas eficaces disponibles. Esto permite que la mayoría de los pacientes se encuentren clínicamente estables a largo plazo. Sin embargo, estos tratamientos no están exentos de efectos secundarios y la necesidad de tener que cambiar tratamientos o de mantener estos a dosis altas multiplica la probabilidad de presentar efectos adversos por lo que la farmacorresistencia es una variable importante a tener en cuenta. En nuestra muestra los pacientes con timoma precisaron mayor número de fármacos para controlarse. Conocer la probabilidad de farmacorresistencia en función de las características de cada paciente permite individualizar tratamientos priorizando terapias de segunda línea para los pacientes con mayor riesgo y limitando los cambios ineficaces de medicación y la acumulación de efectos secundarios.

Encontramos que la recidiva del timoma se asoció frecuentemente con empeoramiento de los síntomas miasténicos. Esto plantea la necesidad de repetir pruebas de imagen torácica a los pacientes con MG y antecedente de timoma que presenten empeoramiento de sus síntomas miasténicos. A pesar de este empeoramiento, el pronóstico a largo plazo fue similar en los pacientes con recidiva del timoma en comparación con aquellos con timoma no recidivante lo que refleja la eficacia del tratamiento médico de la MG, así como del oncológico. Una baja proporción de pacientes con timoma presentaron lesiones irresecables. Estos pacientes tuvieron un peor pronóstico de la MG y mayor mortalidad. Generalmente se intentan evitar los inmunosupresores en el grupo de pacientes con neoplasias activas lo que dificulta el manejo de la MG. Además, estos pacientes son sistemáticamente excluidos de los ensayos clínicos de nuevos fármacos para la MG por lo que son necesarios estudios que incluyan a pacientes con timoma activo para poder determinar el manejo más eficaz de la MG en estos pacientes.

En resumen, el estudio de forma específica de los pacientes con MG asociada a timoma nos ha permitido identificar un biomarcador, el CTLA4, que se encuentra reducido en el timo de estos pacientes y que podría desempeñar un papel en la patogenia de la enfermedad. Por otro

lado, nos ha permitido determinar que se trata de un grupo con peor pronóstico y que dentro de este, los pacientes con timoma recidivante o irresecable representarían un subgrupo de especial riesgo. Por ello concluimos que los pacientes con MG asociada a timoma constituyen una población particular dentro de la enfermedad con unas características clínicas e inmunopatogénicas específicas.

7. CONCLUSIONES

- El número de células que expresan CTLA4 se encuentra reducido en los timomas de pacientes con MG en comparación con aquellos sin MG. Existe una tendencia no significativa a un mayor riesgo de desarrollar MG en los pacientes con el genotipo GG del polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4*.
- Los pacientes con MG asociada a timoma presentan una mayor gravedad de la enfermedad, mayor mortalidad y mayor riesgo de farmacorresistencia. Las recidivas del timoma coinciden frecuentemente con un empeoramiento a largo plazo. Los pacientes con timoma no resecable representan un subgrupo de peor pronóstico.
- El estudio específico de los diferentes subgrupos de pacientes con MG pone de manifiesto la gran heterogeneidad de esta enfermedad permitiendo por un lado encontrar nuevas posibles dianas terapéuticas específicas y por otro lado, identificar pacientes de mayor riesgo facilitando el tratamiento individualizado y en definitiva, un mejor manejo clínico.

8. LÍNEAS DE FUTURO

En el primer artículo de esta tesis, se observó una disminución en la cantidad de células CTLA4+ en los timomas de pacientes con MG en comparación con los de aquellos sin MG. Para determinar si este hallazgo se debe a una menor expresión de CTLA4, se requieren estudios con técnicas específicas para detectar la expresión proteica. La replicación de este estudio utilizando técnicas más precisas como la citometría de masas, RNAseq o Simoa proporcionaría datos adicionales sobre la implicación de la expresión de CTLA4 en la fisiopatogenia de la MG asociada a timoma. Además, sería interesante ampliar estos estudios a otros subgrupos de la enfermedad en investigaciones futuras.

Por otro lado, se encontró que ciertos polimorfismos del gen *CTLA4* se relacionaban con mayor frecuencia con MG en pacientes con timoma, aunque estas diferencias no alcanzaron significancia estadística. Sería necesario ampliar el tamaño de la muestra en futuros estudios para confirmar o descartar este hallazgo. Además, en investigaciones posteriores, sería interesante incluir otros biomarcadores tanto tímicos como periféricos para determinar qué procesos están implicados en el desencadenamiento de la autoinmunidad y cuáles son simplemente epifenómenos. En caso de confirmarse la implicación de CTLA4 en la fisiopatogenia de la enfermedad, esto abriría la puerta a una nueva diana terapéutica. Actualmente existen agonistas de CTLA4 que se utilizan en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes y que podrían ser objeto de estudio para su aplicación en la MG.

En el segundo artículo, se encontró que los pacientes con MG asociada a timoma conforman un subgrupo con peor pronóstico y mayor farmacorresistencia. Debido a la falta de evidencia científica, no existen guías específicas para el manejo terapéutico de estos pacientes en la actualidad. Es necesario llevar a cabo más estudios que determinen si se beneficiarían de tratamientos más agresivos desde el principio. La evidencia es aún más escasa en los casos de recidivas del timoma o lesiones persistentes. Estos pacientes, que son poco frecuentes, presentan una evolución de los síntomas miasténicos más desfavorable. En muchas ocasiones, el diagnóstico de la recidiva coincide con un empeoramiento de la MG, lo que plantea la indicación de repetir pruebas de imagen en pacientes con MG asociada a timoma y deterioro clínico. Sin embargo, se requieren estudios dirigidos para respaldar adecuadamente esta recomendación. Además, en pacientes con timoma activo, suele existir una limitación del tratamiento inmunosupresor debido al temor de empeorar la evolución de la neoplasia. Estos pacientes son sistemáticamente excluidos de ensayos clínicos, incluso aquellos que evalúan fármacos nuevos con mecanismos específicos y menor riesgo potencial de reducir la inmunidad tumoral. Por lo tanto, se necesitan estudios que incluyan a este grupo de pacientes.

Los resultados de esta tesis destacan la importancia de continuar investigando las características fisiopatológicas y clínicas de cada subgrupo de la enfermedad de manera específica. Esto permitiría un manejo personalizado para cada paciente y el desarrollo de terapias dirigidas y específicas. Es fundamental seguir explorando en profundidad los mecanismos involucrados en la MG asociada a timoma, con el objetivo de mejorar el pronóstico y encontrar estrategias terapéuticas más efectivas.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Keesey J. Myasthenia Gravis. *Arch Neurol*. 1998 May 1;55(5):745.
2. Walker MB. Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. *Lancet*. 1934 Jun;223(5779):1200–1.
3. Strauss AJL, Seegal BC, Hsu KC, Burkholder PM, Nastuk WL, Osserman KE. Immunofluorescence Demonstration of a Muscle Binding, Complement-Fixing Serum Globulin Fraction in Myasthenia Gravis. *Exp Biol Med*. 1960 Oct 1;105(1):184–91.
4. Almon RR, Andrew CG, Appel SH. Serum Globulin in Myasthenia Gravis: Inhibition of α -Bungarotoxin Binding to Acetylcholine Receptors. *Science* (80-). 1974 Oct 4;186(4158):55–7.
5. Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune Response to Acetylcholine Receptor. *Science* (80-). 1973 May 25;180(4088):871–2.
6. Toyka K V., Drachman DB, Griffin DE, Pestronk A, Winkelstein JA, Fischbeck KH, et al. Myasthenia Gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med*. 1977 Jan 20;296(3):125–31.
7. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Autoantibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*. 2001 Mar;7(3):365–8.
8. Keesey J. The most vulnerable synapse: historic aspects of neuromuscular junction disorders. In: *Handbook of Clinical Neurology*. 2008. p. 1–25.
9. Wolfe GI, Kaminski HJ, Aban IB, Minisman G, Kuo H-C, Marx A, et al. Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*. 2016 Aug 11;375(6):511–22.
10. Cetin H, Vincent A. Pathogenic Mechanisms and Clinical Correlations in Autoimmune Myasthenic Syndromes. *Semin Neurol*. 2018 Jun 16;38(03):344–54.
11. Roses AD, Olanow CW, McAdams MW, Lane RJM. No direct correlation between serum antiacetylcholine receptor antibody levels and clinical state of individual patients with myasthenia gravis. *Neurology*. 1981 Feb 1;31(2):220–220.
12. Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2006 Nov 1;116(11):2843–54.
13. Rivner MH, Quarles BM, Pan J, Yu Z, Howard JF, Corse A, et al. Clinical features of LRP4/agrin-antibody-positive myasthenia gravis: A multicenter study. *Muscle Nerve*. 2020 Sep 10;62(3):333–43.
14. Shen C, Lu Y, Zhang B, Figueiredo D, Bean J, Jung J, et al. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 2013 Dec 2;123(12):5190–202.
15. Gallardo E, Martínez-Hernández E, Titulaer MJ, Huijbers MG, Martínez MA, Ramos A, et al. Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(10):1003–7.
16. 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.
17. Díaz-Manera J, Cortés-Vicente E, Querol L, Illa I, Gallardo E, Martínez MÁ, et al. Clinical Characteristics of Patients With Double-Seronegative Myasthenia Gravis and Antibodies to Cortactin. *JAMA Neurol.* 2016;73(9):1099.
 18. Romi F, Hong Y, Gilhus NE. Pathophysiology and immunological profile of myasthenia gravis and its subgroups. *Curr Opin Immunol.* 2017 Dec;49:9–13.
 19. Romi F, Suzuki S, Suzuki N, Petzold A, Plant GT, Gilhus NE. Anti-voltage-gated potassium channel Kv1.4 antibodies in myasthenia gravis. *J Neurol.* 2012 Jul 14;259(7):1312–6.
 20. Zoltowska Katarzyna M, Belya K, Leite M, Patrick W, Vincent A, Beeson D. Collagen Q – A potential target for autoantibodies in myasthenia gravis. *J Neurol Sci.* 2015 Jan;348(1–2):241–4.
 21. Gasperi C, Melms A, Schoser B, Zhang Y, Melchoranta J, Risson V, et al. Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis. *Neurology.* 2014 Jun 3;82(22):1976–83.
 22. Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, Lazaridis K, Zisimopoulou P, Tzartos S. Myasthenia gravis — autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol.* 2016 May 22;12(5):259–68.
 23. Wang Z, Wang W, Chen Y, Wei D. T helper type 17 cells expand in patients with myasthenia-associated thymoma. *Scand J Immunol.* 2012 Jul;76(1):54–61.
 24. Zhang C-J, Gong Y, Zhu W, Qi Y, Yang C-S, Fu Y, et al. Augmentation of Circulating Follicular Helper T Cells and Their Impact on Autoreactive B Cells in Myasthenia Gravis. *J Immunol.* 2016 Oct 1;197(7):2610–7.
 25. Balandina A, Lécart S, Darteville P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):735–41.
 26. Thiruppathi M, Rowin J, Li Jiang Q, Sheng JR, Prabhakar BS, Meriglioli MN. Functional defect in regulatory T cells in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci.* 2012 Dec;1274(1):68–76.
 27. Wu Y, Luo J, Garden OA. Immunoregulatory Cells in Myasthenia Gravis. *Front Neurol.* 2020 Dec 15;11(December):1–9.
 28. Rich R, Fleisher T, Shearer W, Schroeder H, Frew A, Weyand C. Clinical Immunology 5th Edition Principles and Practice. Fifth Edit. Clinical immunology. Elsevier; 2020. 19–38 p.
 29. Rich R, Fleisher T, Shearer W, Schroeder H, Frew A WC. Inmunología Clínica: Principios y práctica. 5^a. Elsevier; 2020.
 30. Melzer N, Ruck T, Fuhr P, Gold R, Hohlfeld R, Marx A, et al. Clinical features, pathogenesis, and treatment of myasthenia gravis: a supplement to the Guidelines of the German Neurological Society. *J Neurol.* 2016 Aug 17;263(8):1473–94.
 31. Bernard C, Frih H, Pasquet F, Kerever S, Jamilloux Y, Tronc F, et al. Thymoma

- associated with autoimmune diseases: 85 cases and literature review. *Autoimmun Rev.* 2016;15(1):82–92.
32. Gilhus NE, Verschuur JJ. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* 2015 Oct;14(10):1023–36.
 33. Okumura M, Miyoshi S, Fujii Y, Takeuchi Y, Shiono H, Inoue M, et al. Clinical and functional significance of WHO classification on human thymic epithelial neoplasms: A study of 146 consecutive tumors. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(1):103–10.
 34. Safieddine N, Liu G, Cunningham K, Ming T, Hwang D, Brade A, et al. Prognostic Factors for Cure, Recurrence and Long-Term Survival After Surgical Resection of Thymoma. *J Thorac Oncol.* 2014 Jul;9(7):1018–22.
 35. Moser B, Fadel E, Fabre D, Keshavjee S, de Perrot M, Thomas P, et al. Surgical therapy of thymic tumours with pleural involvement: An ESTS Thymic Working Group Project. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2017;52(2):346–55.
 36. Kondo K, Monden Y. Therapy for thymic epithelial tumors: a clinical study of 1,320 patients from Japan. *Ann Thorac Surg.* 2003 Sep;76(3):878–84.
 37. Buckley C, Douek D, Newsom-Davis J, Vincent A, Willcox N. Mature, long-lived CD4+ and CD8+ T cells are generated by the thymoma in myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 2001 Jul;50(1):64–72.
 38. Ströbel P, Rosenwald A, Beyersdorf N, Kerkau T, Elert O, Murumägi A, et al. Selective loss of regulatory T cells in thymomas. *Ann Neurol.* 2004 Dec;56(6):901–4.
 39. Lefevre CM, Payet CA, Fayet O-M, Maillard S, Truffault F, Bondet V, et al. Risk factors associated with myasthenia gravis in thymoma patients: The potential role of thymic germinal centers. *J Autoimmun.* 2020 Jan;106(August):102337.
 40. Giraud M, Taubert R, Vandiedonck C, Ke X, Lévi-Strauss M, Pagani F, et al. An IRF8-binding promoter variant and AIRE control CHRNA1 promiscuous expression in thymus. *Nature.* 2007 Aug 8;448(7156):934–7.
 41. Ströbel P, Murumägi A, Klein R, Luster M, Lahti M, Krohn K, et al. Deficiency of the autoimmune regulator AIRE in thymomas is insufficient to elicit autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS-1). *J Pathol.* 2007 Apr;211(5):563–71.
 42. Suzuki E, Kobayashi Y, Yano M, Fujii Y. Infrequent and low AIRE expression in thymoma: Difference in AIRE expression among WHO subtypes does not correlate with association of MG. *Autoimmunity.* 2008 Jan 7;41(5):377–82.
 43. Ramanujam R, Pirskaanen R, Ramanujam S, Hammarström L. Utilizing Twins Concordance Rates to Infer the Predisposition to Myasthenia Gravis. *Twin Res Hum Genet.* 2011 Apr 1;14(2):129–36.
 44. Zagoriti Z, Kambouris ME, Patrinos GP, Tzartos SJ, Poulias K. Recent Advances in Genetic Predisposition of Myasthenia Gravis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:1–12.
 45. 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 Apr 1;72(4):396.

46. Dubois PCA, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet*. 2010;42(4):295–302.
47. Gregersen PK, Amos CI, Lee AT, Lu Y, Remmers EF, Kastner DL, et al. REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):820–3.
48. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2009 Jun 1;41(6):703–7.
49. Chu X, Pan CM, Zhao SX, Liang J, Gao GQ, Zhang XM, et al. A genome-wide association study identifies two new risk loci for Graves' disease. *Nat Genet*. 2011 Sep 14;43(9):897–901.
50. Huang D, Liu L, Norén K, Xia S, Trifunovic J, Pirskanen R, et al. Genetic association of Ctla-4 to myasthenia gravis with thymoma. *J Neuroimmunol*. 1998 Aug;88(1–2):192–8.
51. Chuang W-Y, Ströbel P, Gold R, Nix W, Schalke B, Kiefer R, et al. A CTLA4high genotype is associated with myasthenia gravis in thymoma patients. *Ann Neurol*. 2005 Oct;58(4):644–8.
52. Makarios D, Horwood K, Coward JIG. Myasthenia gravis: An emerging toxicity of immune checkpoint inhibitors. *Eur J Cancer*. 2017 Sep;82:128–36.
53. Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol*. 2015;36(2):63–70.
54. Longoria TC, Eskander RN. Immune checkpoint inhibition: therapeutic implications in epithelial ovarian cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2015 Aug 23;10(2):133–44.
55. Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO, McConville J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol*. 2010 Dec 18;10(1):46.
56. Aragonès JM, Bolíbar I, Bonfill X, Bufill E, Mummany A, Alonso F II. Myasthenia gravis: A higher than expected incidence in the elderly. *Neurology*. 2003;60(6):1024–6.
57. Pakzad Z, Aziz T, Oger J. Increasing incidence of myasthenia gravis among elderly in British Columbia, Canada. *Neurology*. 2011 Apr 26;76(17):1526–8.
58. Cortés-Vicente E, Álvarez-Velasco R, Segovia S, Paradas C, Casasnovas C, Guerrero-Sola A, et al. Clinical and therapeutic features of myasthenia gravis in adults based on age at onset. *Neurology*. 2020 Mar 17;94(11):e1171–80.
59. Evoli A. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain*. 2003 Jun 23;126(10):2304–11.
60. Chatzistefanou KI, Kouris T, Iliakis E, Piaditis G, Tagaris G, Katsikeris N, et al. The Ice Pack Test in the Differential Diagnosis of Myasthenic Diplopia. *Ophthalmology*. 2009 Nov;116(11):2236–43.

61. BAROHN RJ, McINTIRE D, HERBELIN L, WOLFE GI, NATIONS S, BRYAN WW. Reliability Testing of the Quantitative Myasthenia Gravis Scorea. Ann N Y Acad Sci. 1998 May;841(1 MYASTHENIA GR):769–72.
62. Benatar M. A systematic review of diagnostic studies in myasthenia gravis. Neuromuscul Disord. 2006 Jul;16(7):459–67.
63. Harper CM. Electromyographic aspects of neuromuscular junction disorders. In: Handbook of Clinical Neurology. 2008. p. 149–68.
64. Pasnoor M, Dimachkie MM, Farmakidis C, Barohn RJ. Diagnosis of Myasthenia Gravis. Neurol Clin. 2018 May;36(2):261–74.
65. Gilhus NE, Tzartos S, Evoli A, Palace J, Burns TM, Verschueren JJGM. Myasthenia gravis. Nat Rev Dis Prim. 2019 May 2;5(1):30.
66. Sanders DB, Wolfe GI, Benatar M, Evoli A, Gilhus NE, Illa I, et al. International consensus guidance for management of myasthenia gravis. Neurology. 2016 Jul 26;87(4):419–25.
67. Cortés-Vicente E, Gallardo E, Álvarez-Velasco R, Illa I. Myasthenia Gravis Treatment Updates. Curr Treat Options Neurol. 2020 Aug 15;22(8):24.
68. Díaz-Manera J, Martínez-Hernández E, Querol L, Klooster R, Rojas-García R, Suárez-Calvet X, et al. Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. Neurology. 2012;78(3):189–93.
69. Jurado J, Javidfar J, Newmark A, Lavelle M, Bacchetta M, Gorenstein L, et al. Minimally Invasive Thymectomy and Open Thymectomy: Outcome Analysis of 263 Patients. Ann Thorac Surg. 2012 Sep;94(3):974–82.
70. Baggi F, Andreetta F, Maggi L, Confalonieri P, Morandi L, Salerno F, et al. Complete stable remission and autoantibody specificity in myasthenia gravis. Neurology. 2013 Jan 8;80(2):188–95.
71. Andersen JB, Gilhus NE, Sanders DB. Factors affecting outcome in myasthenia gravis. Muscle Nerve. 2016 Dec;54(6):1041–9.
72. Beghi E, Antozzi C, Batocchi AP, Cornelio F, Cosi V, Evoli A, et al. Prognosis of myasthenia gravis: A multicenter follow-up study of 844 patients. J Neurol Sci. 1991 Dec;106(2):213–20.
73. Mantegazza R, Baggi F, Antozzi C, Confalonieri P, Morandi L, Bernasconi P, et al. Myasthenia gravis (MG): Epidemiological data and prognostic factors. Ann N Y Acad Sci. 2003;998:413–23.
74. Mao Z-F, Mo X-A, Qin C, Lai Y-R, Olde Hartman TC. Course and prognosis of myasthenia gravis: a systematic review. Eur J Neurol. 2010 Jul;17(7):913–21.
75. Budde JM, Morris CD, Gal AA, Mansour KA, Miller JI. Predictors of outcome in thymectomy for myasthenia gravis. Ann Thorac Surg. 2001;72(1):197–202.
76. Kaufman AJ, Palatt J, Sivak M, Raimondi P, Lee DS, Wolf A, et al. Thymectomy for Myasthenia Gravis: Complete Stable Remission and Associated Prognostic Factors in Over 1000 Cases. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2016;28(2):561–8.

77. Kim H, Lim Y-M, Lee E-J, Oh YJ, Kim K-K. Factors predicting remission in thymectomized patients with acetylcholine receptor antibody-positive myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2018 Dec;58(6):796–800.
78. de Perrot M, Liu J, Bril V, McRae K, Bezjak A, Keshavjee SH. Prognostic significance of thymomas in patients with myasthenia gravis. *Ann Thorac Surg*. 2002 Nov;74(5):1658–62.
79. Ströbel P, Rosenwald A, Beyersdorf N, Kerkau T, Eiert O, Murumägi A, et al. Selective loss of regulatory T cells in thymomas. *Ann Neurol*. 2004;56(6):901–4.
80. Na KJ, Hyun K, Kang CH, Park S, Lee HJ, Park IK, et al. Predictors of post-thymectomy long-term neurological remission in thymomatous myasthenia gravis: an analysis from a multi-institutional database. *Eur J Cardio-Thoracic Surg*. 2020;57(5):867–73.
81. Tsinzerling N, Lefvert AK, Matell G, Pirskanen-Matell R. Myasthenia gravis: A long term follow-up study of Swedish patients with specific reference to thymic histology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(10):1109–12.
82. Gradolatto A, Nazzal D, Truffault F, Bismuth J, Fadel E, Foti M, et al. Both Treg cells and Tconv cells are defective in the Myasthenia gravis thymus: Roles of IL-17 and TNF- α . *J Autoimmun*. 2014 Aug;52(2014):53–63.
83. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity*. 2014 Dec;41(6):1026–39.
84. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2010 Jan 17;11(1):21–7.
85. Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier M-C, Polychronakos C. A Common Autoimmunity Predisposing Signal Peptide Variant of the Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 Results in Inefficient Glycosylation of the Susceptibility Allele. *J Biol Chem*. 2002 Nov;277(48):46478–86.
86. Juran BD, Atkinson EJ, Schlicht EM, Fridley BL, Lazaridis KN. Primary Biliary Cirrhosis Is Associated With a Genetic Variant in the 3' Flanking Region of the CTLA4 Gene. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1200–6.
87. Qu H-Q, Bradfield JP, Grant SFA, Hakonarson H, Polychronakos C. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes Immun*. 2009 Dec 2;10(S1):S27–32.
88. 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.
89. Robertson NP, Deans J, Compston DAS. Myasthenia gravis: a population based epidemiological study in Cambridgeshire, England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998 Oct 1;65(4):492–6.
90. Gilhus NE. Myasthenia Gravis. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2016 Dec 29;375(26):2570–81.

