



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

DEFICIENCIA EN LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE 25-HIDROXIVITAMINA D Y SU SIGNIFICADO CLÍNICO EN PACIENTES CON MIASTENIA GRAVIS

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:
ESPECIALIDAD EN NEUROLOGÍA

PRESENTA:
DRA. CAROL MIROSLAVA AGUILAR ALVARADO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ERWIN CHIQUETE ANAYA

MÉXICO D.F. AGOSTO 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



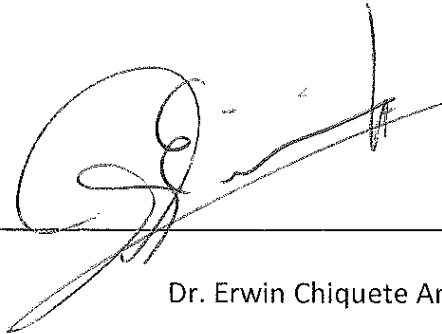
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

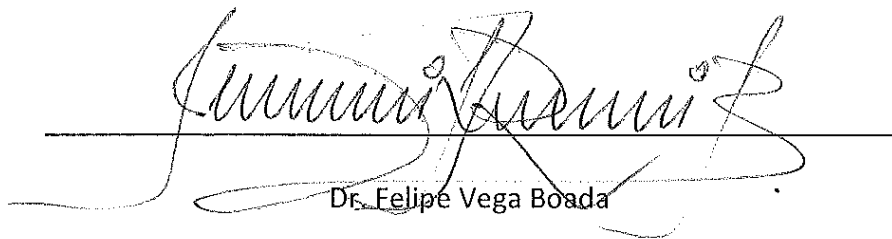
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEFICIENCIA EN LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE 25-HIDROXIVITAMINA D Y SU
SIGNIFICADO CLÍNICO EN PACIENTES CON MIASTENIA GRAVIS



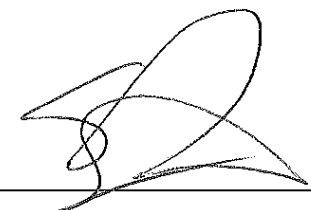
Dr. Erwin Chiquete Anaya

Director de Tesis



Dr. Felipe Vega Boada

Profesor Titular del Curso de Neurología



Dr. Sergio Ponce de León

Jefe del Departamento de Enseñanza



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. "SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Roca mía y la fuerza de mi salvación; mi alto refugio, en ti he confiado.

A MI FAMILIA:

Por su incondicional apoyo, comprensión y sabios consejos.

A MI TUTOR:

Dr. Erwin Chiquete

Por su magnífica y acertada colaboración.

A MIS AMIGOS:

Por su total apoyo y magníficos momentos compartidos.

ÍNDICE

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

JUSTIFICACIÓN

MARCO TEÓRICO

OBJETIVOS

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

HIPÓTESIS

METODOLOGÍA

ANÁLISIS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

CONSIDERACIONES ÉTICAS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune de la placa neuromuscular. La vitamina D tiene funciones inmunorreguladoras, que se están caracterizando actualmente. Se ha descrito deficiencia de 25-hidroxivitamina D (la forma que más fidedignamente indica los depósitos de vitamina D) en diferentes enfermedades autoinmunes, por lo que se discute sobre si se debe suplementar o no a los pacientes con este tipo de enfermedades. Por ende su suplementación podría prevenir la autoinmunidad y mejorar la evolución clínica de los pacientes. Hasta donde sabemos, no existe ningún estudio en México que evalúe el status de los niveles de vitamina D en pacientes con miastenia gravis. Esto podría representar una importante limitación, si consideramos que la restitución de dichos niveles pudiera asociarse a mejor estado clínico de su enfermedad. Mediante la caracterización de los niveles de 25-hidroxivitamina D en pacientes mexicanos con miastenia gravis, podrían proponerse nuevos estudios encaminados a determinar el valor pronóstico de dicha evaluación nutricional, y, eventualmente, el papel de la restitución de esta vitamina en el tratamiento de estos pacientes. Este estudio caracteriza el status de la concentración sanguínea de 25-hidroxivitamina D en pacientes con miastenia gravis de nuestro instituto, mediante la medición de este micronutriente en nuestro laboratorio central y con las evaluaciones clínicas que realizamos en el Departamento de Neurología y Psiquiatría.

II. JUSTIFICACIÓN

La miastenia gravis es una enfermedad neuromuscular autoinmune dependiente de células T y causada por anticuerpos dirigidos contra las proteínas o receptores de la unión neuromuscular. Así, se considera que las células T juegan un papel importante en el inicio y curso de la enfermedad. La vitamina D es en realidad una prohormona que ejerce una acción endocrina, entre otras, en las células del sistema inmune, generando un efecto inmunorregulador que se considera reside en el incremento de la cantidad de células T reguladoras y manteniendo la función muscular a través de su efecto sobre el receptor de vitamina D en el músculo. Por lo tanto, se propone que existe una asociación entre la deficiencia de vitamina D con la actividad autoinmune en enfermedades tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

Según lo que conocemos de la literatura médica indizada, existen solo dos estudios a nivel mundial y ninguno en la República Mexicana sobre la determinación de los niveles de vitamina D en enfermedades neuromusculares autoinmunes como la miastenia gravis. El más significativo de estos estudios, realizado en Suecia y publicado en diciembre 2012 por Askmark et al., describe que los niveles de 25-hidroxivitamina D en plasma fueron significativamente más bajos en pacientes con miastenia gravis, comparados con controles sanos. Con la posterior suplementación con colecalciferol observaron incremento en los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D y mejoría clínica. Sin embargo, esta importante observación científica nunca ha sido confirmada.

III. MARCO TEÓRICO

En condiciones normales el músculo para poder contraerse y producir fuerza necesita la transmisión eficiente de un impulso eléctrico de un axón motor hacia las fibras musculares que inerva. La unión neuromuscular es una sinapsis con una organización estructural y funcional compleja, siendo además el sitio donde se lleva a cabo la transformación del impulso nervioso a un potencial de acción de la fibra muscular. Esta sinapsis es particularmente vulnerable a los trastornos autoinmunes causados por factores inmunes circulantes. Entre estos raros desordenes la miastenia gravis (MG) es la más frecuente. Considerándose una enfermedad autoinmune dependiente de células T y causada por autoanticuerpos dirigidos contra las proteínas o receptores de la unión neuromuscular, marcando así el inicio y curso de dicha enfermedad.

EPIDEMIOLOGÍA

Su incidencia anual es de 3 a 4 casos por millón y la prevalencia de 60 casos por millón, aunque en algunos estudios estas cifras pueden ser mayores (Robertson et al., 1998). En México se desconoce la incidencia o prevalencia real, aunque se estima sea similar a lo reportado en otras latitudes (Echeverría G, 2006, Cacho Díaz B 2006). La prevalencia ha aumentado con el tiempo con estimaciones recientes que se acercan a 20 casos por 100,000 en la población estadounidense y la incidencia ha sido reportada tan alta como 21 casos por millón en Barcelona (Meriggioli y Sanders, 2009). Así también, en estudios epidemiológicos realizados en Canadá, Italia y Japón se ha observado un incremento en la frecuencia de la miastenia gravis en adultos mayores en las recientes décadas. En British Columbia el número anual de casos nuevos diagnosticados con miastenia gravis aumentó de 21.4 por millón durante 1984-1988 a 52.9 durante 2004-2008 en adultos mayores con una edad de por lo menos 65 años (Pakzad 2011; Pallaver 2011; Matsuda et al., 2005). Este fenómeno internacional se considera puede ser el resultado de un incremento en el conocimiento de la enfermedad entre el gremio médico considerando más frecuentemente esta posibilidad diagnóstica, reducción en las tasas de mortalidad y aumento en la longevidad de la población.

En general, las mujeres son afectadas cerca de tres veces más que los hombres antes de los 40 años de edad, pero la incidencia es mayor en hombres luego de los 50 años y muy similar durante la pubertad. La MG de inicio en la infancia es poco común en Europa y Norte América, constituyendo el 10-15 % de los casos, pero mucho más frecuente en el continente asiático en países como China, donde más del 50 % de los pacientes inician antes de los 15 años de edad con manifestaciones de la enfermedad (Wong y Hawkings 1992).

PATOGENIA

La miastenia gravis es la enfermedad neuromuscular más común inmunomediada por anticuerpos y bien caracterizada por autoanticuerpos contra el receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) del músculo esquelético, entre otros que son un poco menos frecuentes como los anticuerpos contra la tirosin cinasa músculo específica (MuSK) y la lipoproteína de baja densidad receptor relacionada a proteína 4 (LRP4).

Inmunológicamente, en pacientes con MG las células tímicas sobreexpresan diferentes quimiocinas, las cuales son las responsables de la migración de células B al tejido tímico para producir grandes cantidades de células autorreactivas. Entonces aunque los autoanticuerpos son producidos por las células B, las células Th CD4+ también se necesitan para su producción y el desarrollo de la enfermedad. Las células Th1 producen IFN-gamma, TNF-alfa e IL-2 todos ellos asociados con la autoinmunidad. Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y son las encargadas de promover la proliferación y diferenciación de las células B. Las células T reguladoras (Treg) que han madurado en presencia de células mioides y epiteliales medulares, son exportadas junto a las células T del timo hacia la periferia. Estas se consideran un componente importante, ya que proveen un mecanismo que mantiene la autotolerancia y previene la respuesta autoinmune, pues regula la respuesta inmune de las células Th y B, a través de la supresión de la activación, proliferación y producción de citocinas de las células autorreactivas. Varios estudios han demostrado que estas células Treg tienen un defecto severo en su función supresora, sugiriendo un rol para esta anomalía en la patogénesis de la MG. Este defecto en la actividad funcional de las células Treg podría explicarse por su generación y desarrollo anómalo a nivel tímico, secundario a la alteración de varios factores y entre ellos el más importante la molécula FOXP3 intracelular, que según estudios realizados por Balandina et al. se encuentra en cantidades reducidas en pacientes con miastenia gravis. Una vez que las células T y B son activadas, uno esperaría que su estado de activación fuera regulado por las Treg, pero como estas últimas son disfuncionales no pueden suprimir la respuesta patológica, lo que propicia un alto nivel de células autorreactivas que pueden extender la inflamación y autoinmunidad, causando pérdida del AChR, daño a la unión neuromuscular y fallo de la transmisión neuromuscular (Alahgholi-Hajibehzad M, 2015; Conti-Fine B, 1997)

Los epítopes reconocidos por las células Th CD4+ anti-AChR de pacientes con MG, la estructura de sus receptores de células T y los efectos funcionales de las citocinas que ellas secretan, son importantes para comprender la patogénesis de la enfermedad. Las primeras dos características pueden explicar los mecanismos que desencadenan y mantienen la respuesta anti-AChR. La tercera ayuda a comprender los mecanismos que causan la progresión intermitente de la MG y las diferentes presentaciones clínicas entre los pacientes. Estudios longitudinales han verificado que tanto el número de células Th CD4+ y el número de epítopes que ellas reconocen aumentan conforme la enfermedad va progresando (Wang et al., 1998)

Por otra parte, se debe tomar en cuenta que se han identificado otros tipos de células inmunosupresoras aparte de las Treg CD4+, como las células T CD8+ que también pueden tener funciones inmunomoduladoras (Mokhtarian F et al., 1990) . Los pacientes con MG tienen cantidades variables en sangre de células T CD8+ en comparación con sujetos normales. Quienes presentan debilidad moderada o se encuentran en remisión clínica presentan numerosas células T CD8+ activadas en sangre, mientras que los pacientes severamente afectados tienen muy pocas células T CD8+ activadas; un incremento en estas células T CD8+ puede predecir una mejoría de las manifestaciones clínicas (Protti et al., 1990). Las células T CD8+ inhiben la respuesta anti-AChR de las células Th CD4+ in vitro y la remoción de las células T CD8+ de las células mononucleares de pacientes con MG causa un incremento en las células B productoras de anticuerpos y de los anticuerpos anti-AChR (Lisak et al., 1986). Por lo que un balance precario entre las células Th CD4+ autoinmunes activadas y las células T CD8+ capaces de modular la reactividad autoinmune de las células Th CD4+, podría explicar el carácter recidivante de la miastenia gravis y muchas otras enfermedades autoinmunes.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y CURSO

Los signos y síntomas de un trastorno post sináptico en la unión neuromuscular como en el caso de la miastenia gravis, resultan de la fluctuación en la fuerza de los músculos voluntarios. El grado de fatigabilidad va a depender en parte del esfuerzo que se realice con un determinado grupo muscular, siendo la fatigabilidad exagerada el marco de los síntomas que reflejan una transmisión neuromuscular anormal, típicamente menos pronunciados por la mañana o luego del reposo y más pronunciados conforme avanza el día o posterior al uso prolongado de los músculos afectados. Visión borrosa, diplopía o ptosis palpebral son los síntomas iniciales en cerca del 60% de los pacientes con MG y la mayoría del resto de pacientes presentan estos síntomas en algún momento dentro de los dos años luego del inicio de la enfermedad (Sanders y Massey, 2008). Los síntomas de debilidad muscular orofaríngea o bulbares como dificultad para masticar, deglutir o hablar están presentes en aproximadamente el 20% de los pacientes. Por último, el 20% restante se puede presentar con debilidad de un grupo muscular como cuello o extensores de los dedos, flexores de la cadera o dorsiflexores del tobillo (Grob et al., 1981; Kuks y Oosterhuis, 2004). En un estudio realizado en la Clínica de miastenia gravis de la Universidad de Duke en Durham Carolina del Norte, Estados Unidos, donde se evaluaron 919 pacientes, el 70% presentaron como manifestación inicial de miastenia gravis síntomas oculares, el 22% síntomas bulbares y el 5.4% debilidad muscular axial o de extremidades.

El curso de la miastenia gravis es variable pero usualmente progresa en severidad y distribución de la debilidad durante los primeros uno a dos años. Es frecuente que existan episodios de mejoría espontánea, incluso por períodos prolongados, pero estas “remisiones” son raramente permanentes (Sanders y Massey 2008). La debilidad permanece restringida a los músculos oculares en 10 al 16% de los casos. La mayoría de

los pacientes desarrollan debilidad orofaríngea o de los músculos de las extremidades en los primeros tres años, la cual alcanza su máxima severidad durante el primer año en dos tercios de los pacientes (Grob D, 1981; Kuks y Oosterhuis, 2004).

Existen muchos factores que pueden empeorar los síntomas de la MG, tales como enfermedades sistémicas (especialmente enfermedades respiratorias virales con fiebre), hipo o hipertiroidismo, embarazo, ciclo menstrual, fiebre, trastornos emocionales y medicamentos. Además, recientemente se ha considerado que los niveles séricos insuficientes o deficientes de 25-hidroxivitamina D pueden tener un efecto negativo directo en la respuesta autoinmune de esta enfermedad, traduciéndose en exacerbación de los síntomas (Askmark H et al., 2012).

DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de la miastenia gravis se requiere de una buena comprensión de su fisiopatología, para la adecuada interpretación de los procedimientos diagnósticos que se realizarán al paciente en quien se sospecha de este trastorno de la unión neuromuscular.

La consideración más importante en el rendimiento de la prueba de edrofonio es la elección de su interpretación clínica, por lo que sólo una inequívoca mejoría en la fuerza del músculo afectado es aceptable como un resultado positivo. Por esta razón, la resolución de la ptosis palpebral, la mejoría en la fuerza de un músculo extraocular parético o la clara mejoría de la disartria se han propuesto como las únicas verdaderas respuestas. Se ha reportado que esta prueba es positiva en 60 a 95% de pacientes con MG ocular y en 72-95% con MG generalizada (Pascuzzi 2003). Para su realización se inyecta una dosis inicial de 2 mg y se monitorea la respuesta por 60 segundos, se pueden inyectar dosis subsecuentes de 3 y 5 mg, pero si se observa mejoría clara en los 60 segundos después de cualquiera de las dosis la prueba es positiva.

La medición de anticuerpos que reaccionan con las proteínas del AChR si se encuentran elevados en un paciente con datos clínicos compatibles, confirma el diagnóstico de MG, pero si son normales no excluyen dicha enfermedad. El análisis de los anticuerpos anti-AChR puede ser normal al inicio de los síntomas y virar a anormal más tarde durante la evolución de la enfermedad, por lo que repetirlos es apropiado cuando los valores obtenidos dentro de los 6 a 12 meses de inicio de síntomas fueron normales. Además, se pueden realizar determinaciones de anticuerpos contra la tirosin cinasa músculo específica (MuSK) que se encuentran presentes hasta en 50% de los pacientes con MG generalizada que son seronegativos a los anti-AChR y en algunos pacientes con MG ocular.

Dentro de los estudios electrodiagnósticos la estimulación nerviosa repetitiva es el más frecuentemente realizado. A tasas bajas de estimulación de 2 a 5 Hz la estimulación nerviosa repetitiva depleta la reserva de ACh en las placas motoras alteradas, causando una falla en la transmisión neuromuscular. En la MG hay una respuesta de decremento

de al menos 10% a trenes de estimulación de 2 a 3 Hz, esto puede presentarse al inicio o después de un período de ejercicio, lo que se conoce como agotamiento postactivación (Kaminski 2003). La sensibilidad de este estudio para el diagnóstico de MG se ha reportado en rangos de 53 a 100% en la MG generalizada y de 10 a 48% en la ocular. La EMG de fibra única es el estudio más sensible de la transmisión neuromuscular y muestra un jitter incrementado en algunos músculos en casi todos los pacientes con MG (Stålberg et al, 2010).

La prueba de hielo consiste en que al colocar un paquete de hielo sobre el ojo con ptosis palpebral durante 2 minutos, con lo que mejora la elevación del párpado. Esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad en miastenia gravis, lo que sugiere que puede ser de utilidad en pacientes con ptosis palpebral, particularmente si la prueba de edrofonio es negativa o está contraindicado (Larner, 2004).

TRATAMIENTO

Se debe individualizar el plan de tratamiento con cada paciente, el cual más adelante se deberá ir ajustando en base a la respuesta terapéutica. Existen diferentes opciones, que tomaran distintos tiempos antes de mejorar la debilidad muscular, entre ellos los inhibidores de acetilcolinesterasa como la piridostigmina que se utiliza para mejorar la neurotransmisión neuromuscular; inmunoglobulina y plasmaféresis para el tratamiento de las exacerbaciones agudas; inmunosupresores y timentomía (Sieb, 2013). Sin embargo, en los últimos años se han propuesto nuevos enfoques que están siendo investigados como terapias para la MG y que se basan en inducir la generación de células Treg, entre estos el uso de vitamina D.

En el año 2012 un grupo de neurólogos del Hospital Universitario Uppsala y del Instituto de Neurociencias de Uppsala, Suecia publicaron un estudio en el que incluyeron 33 pacientes con miastenia gravis en quienes observaron que los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D eran de forma significativa más bajos que en controles sanos, teniendo esto implicaciones en la respuesta autoinmune y la debilidad muscular, ya que posterior a que se les suplementara con colecalciferol 800 UI/día por un período promedio de 6 meses hubo incremento en los niveles de vitamina D y al realizar una evaluación objetiva con la escala MGC para medir la severidad de la fatigabilidad, encontraron una mejoría clínica del 38% (P=0.05) (Askmark H et al., 2012). Esto se explica por el efecto dual que podría tener la vitamina D, primero regulando la respuesta autoinmune pues se ha visto que la 1,25 dihidroxivitamina D3 incrementa la frecuencia de células Treg CD4+ FOXP3+ y la administración de vitamina D puede detener el deterioro de las células Treg en pacientes con MG in vitro (Alahgholi-Hajibehzad M, 2015) y segundo manteniendo la función muscular a través de su efecto sobre el receptor de vitamina D en el músculo. La forma metabólicamente activa de la vitamina D que es la 1,25-dihidroxivitamina D, se cree ejerce su efecto inmunorregulador incrementando la cantidad de células T reguladoras. Estudios experimentales han revelado que la 1,25-dihidroxivitamina D es capaz de sesgar

las células T a un estado con mayor efecto antiinflamatorio y regulador (Prieti B et al., 2010). Por lo que al tratarse la miastenia gravis de una enfermedad dependiente de células T CD4+, se especula la 1,25-dihidroxitamina D entonces podría jugar un papel importante en la función de las células T reguladoras (Askmark H et al., 2012). Así también, ha surgido evidencia reciente sobre el efecto de esta forma activa de la vitamina D en el mantenimiento de la función muscular, el cual se refleja en la proliferación, progresión y diferenciación de las células mioblásticas a miotúbulos. En 2011 fue publicado un estudio realizado en Los Angeles, California, Estados Unidos por la Charles R. Drew University of Medicine and Science y la Escuela de Medicina de Los Angeles, en el que al agregar 1,25 dihidroxivitamina D a mioblastos C2-C12 observaron un incremento en la expresión y translocación nuclear del receptor de vitamina D, disminución de la proliferación celular y promoción de la diferenciación miogénica a través de la disminución de la expresión de miostatina, que es el único regulador negativo conocido de la masa muscular. Demostrando así el efecto directo de la 1,25 dihidroxivitamina D en la diferenciación de las células miogénicas y apoyando la intervención de la vitamina D en los desórdenes musculares (Garcia L et al., 2011).

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el status y significado clínico de la concentración sanguínea de 25-hidroxitamina D en pacientes con miastenia gravis del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de la deficiencia de 25-hidroxitamina D en pacientes con miastenia gravis del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.
- Establecer si los niveles de 25-hidroxitamina D en pacientes con miastenia gravis son inferiores a los límites de normalidad establecidos en nuestro laboratorio.
- Determinar si los niveles de 25-hidroxitamina D en pacientes con miastenia gravis son inferiores a los encontrados en pacientes con otras patologías no autoinmunes.
- Evaluar si existe alguna asociación entre el status de los niveles de 25-hidroxitamina D y la expresión clínica de la miastenia gravis (i.e., subtipo, severidad e inmunoestatus).

V. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Son los niveles de 25-hidroxivitamina D inferiores en pacientes con miastenia gravis en comparación con las personas sin esta enfermedad?
- ¿Cuál es el significado clínico del serostatus de 25-hidroxivitamina D en pacientes con miastenia gravis?

VI. HIPÓTESIS

- Los pacientes con miastenia gravis presentan niveles séricos más bajos de la 25-hidroxivitamina D, en comparación con personas sin esta enfermedad.
- Los niveles séricos de esta vitamina serán inferiores en los pacientes con una peor condición clínica y mayores títulos de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina.

VII. METODOLOGÍA

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional y retrospectivo, de tipo casos y controles, en los pacientes con diagnóstico de miastenia gravis y que contaban con determinación sérica de 25-hidroxivitamina D (casos) y pacientes sin enfermedades autoinmunes identificadas que contaban con determinación sérica de 25-hidroxivitamina D (controles). Se revisaron para ello los expedientes clínicos y se consultó el sistema integral de laboratorio. Los controles fueron pacientes sin enfermedades autoinmunes que parearan por edad y género a los casos identificados.

TAMAÑO DE MUESTRA

Para el cálculo del tamaño de muestra se usaron los datos del único estudio similar comparativo sobre pacientes con miastenia gravis y controles (Askmark H, et al. Eur J Neurol. 2012), en los que se detectó un nivel sérico promedio de vitamina D en pacientes con miastenia gravis 51 ± 19 nmol/L, y en controles sanos de 69 ± 21 nmol/L. Se empleó para el cálculo del tamaño de muestra una fórmula para diferencias de medias entre dos grupos, para detectar una diferencia de al menos 8 nmol/L entre casos y controles (51 vs 69 nmol/L), con un error tipo I del 5%, y un error tipo II del 20%. Así, un tamaño mínimo

(pero no restringido a) 20 pacientes por grupo, satisface el requisito del poder estadístico para detectar esta diferencia.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los criterios de inclusión para los casos fueron pacientes rastreados en el archivo de expedientes clínicos con diagnóstico de miastenia gravis, que contaban con determinación sérica de 25-hidroxivitamina D en el sistema integral de laboratorio. Los controles fueron pacientes con patologías no autoinmunes, que contaban también con determinación sérica de 25 hidroxivitamina D en el periodo comprendido entre el año 2000 y 2014.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyó a todos los pacientes con diagnóstico de miastenia gravis que no contaban con determinación sérica de 25-hidroxivitamina D. Así también se excluyeron los pacientes con alguna enfermedad autoinmune distinta a miastenia gravis.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Se excluyó a todos los pacientes con diagnóstico de miastenia gravis que se encontraban siendo sustituidos con vitamina D como preparación farmacológica, y que no contaban con información clínica completa, particularmente sobre tipo clínico de la miastenia gravis, severidad representada mediante la escala QMGS, fármacos inmunosupresores, número de crisis, entre otros. Los criterios de eliminación para los controles fueron el de la sustitución farmacológica con vitamina D, el de no contar con información clínica completa sobre comorbilidades, así como la presencia de condiciones que originaran una menor absorción intestinal de la vitamina D.

VARIABLES DEPENDIENTES

- Clasificación de Osserman
- Año de diagnóstico de miastenia gravis
- Determinación sérica de 25-hidroxivitamina D
- Antecedente de crisis miasténicas
- Tratamiento inmunosupresor utilizado
- QMGS cercano a determinación sérica de 25-hidroxivitamina D
- Nivel de autoanticuerpos anti receptor de acetilcolina (Anti-AChR) y anti tirosinasa músculo específicos (Anti-Musk)
- Nivel de hemoglobina
- Nivel de hematocrito

- Nivel de volumen globular medio
- Nivel de vitamina B12

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Edad
- Género
- Comorbilidades
- Timectomía

VALIDEZ INTERNA

Los resultados de este análisis son un reflejo muy aproximado de las características propias de la población mexicana, porque el INCMNSZ es un centro de referencia nacional para enfermedades nutricionales, para miastenia gravis, así como para otras enfermedades autoinmunes.

VALIDEZ EXTERNA

Los resultados del estudio podrán ser aplicados a otras poblaciones siempre y cuando cuenten con el diagnóstico acertado de miastenia gravis y con la determinación sérica confiable de 25-hidroxivitamina D.

VIII. ANÁLISIS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se utilizó la prueba t de Student para la comparación de medias entre dos grupos. Para la comparación de frecuencias (porcentaje de casos con deficiencia de vitamina D) se empleó la prueba chi-cuadrada. Se utilizó además la prueba de correlación de Pearson para evaluar la relación directa entre el serostatus de vitamina D y de autoanticuerpos contra el receptor de acetilcolina. Se empleó un modelo de regresión logística binaria para determinar factores asociados a la deficiencia de vitamina D (niveles <20 nmol/L). La prueba de Hosmer-Lemeshow se empleó para evaluar la confiabilidad del modelo, con una $p > 0.20$. Una $p < 0.05$ se consideró como significativa para los análisis de comparación entre grupos. Los cálculos y la asignación aleatoria de los grupos se realizó con el paquete estadístico SPSS v.20.0.

IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para la realización de este estudio de investigación se obtuvo la aprobación parte de las autoridades correspondientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Por tratarse de un estudio observacional y retrospectivo no se requirió de consentimiento informado por parte de los pacientes para la ejecución del mismo, garantizando la confidencialidad de todos los datos obtenidos a través de la revisión de los expedientes clínicos y la consulta del sistema integral de laboratorio; utilizando la información exclusivamente con fines de análisis y estudio.

X. RESULTADOS

En este estudio se analizaron 31 casos de pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” con diagnóstico de miastenia gravis, que contaban con determinación de la concentración sanguínea de 25-hidroxivitamina D en el sistema integral de laboratorio. En la tabla 1 se observa que la media de edad fue de 51.84 años con una desviación estándar de 19.74. Por otra parte la mediana de edad fue de 47 años con un rango intercuartil (RIC) de 21 a 86. Del total de pacientes incluidos, 22 fueron mujeres que corresponde al 71.0% y 9 hombres correspondiendo al 29.0%.

En cuanto a la clasificación clínica de Osserman al momento del diagnóstico, 15 casos correspondiente al 48.4% se presentaron con cuadro clínico de miastenia gravis generalizada leve con afección a musculatura de tronco y extremidades, sin compromiso de músculos respiratorios compatible con la categoría IIa. Seguido de 10 casos (32.3%) que además del cuadro antes descrito presentaban afección bulbar correspondiendo a la categoría IIb y en menor proporción 3 casos (9.7%) para la III y 1 caso (3.2%) para la IV, en las que se encontraban los pacientes con afección respiratoria. Predominando así la variante de miastenia gravis generalizada sobre la ocular, esta última manifestada únicamente en 2 casos correspondiendo al 6.45%

De los 31 pacientes, 22 de ellos fueron intervenidos quirúrgicamente con timectomía, lo que corresponde al 71%. Del tiempo de evolución de la enfermedad desde su diagnóstico, 29% de los casos tenían más de quince años.

Dieciséis pacientes que corresponde al 51.6% presentaban coexistencia de otras enfermedades autoinmunes, entre ellas la principal fue hipotiroidismo, que como es bien conocido los pacientes con miastenia gravis tienen una frecuencia incrementada de padecer otras enfermedades autoinmunes sobretodo de enfermedad tiroidea.

El 83.9% de los pacientes habían recibido tratamiento con inhibidor de acetilcolinesterasa piridostigmina, para un mejor control sintomático de la enfermedad. Asociado al tratamiento sintomático antes mencionado, 9 pacientes correspondiente al 29.0%

recibieron tratamiento inmunosupresor con prednisona. Se utilizaron otros inmunosupresores en la terapia para el control de la miastenia gravis en 18 de los 31 pacientes incluidos en el estudio, equivaliendo al 58.1%.

Contaban con determinación sérica detectable de anticuerpos anti-AChR 21 pacientes que corresponde al 58.1%. La media del resultado sérico expresado en nM/L de dichos anticuerpos fue de 127.63, con una desviación estándar de 244.58. Además, se calculó la media de los resultados séricos de 25-hidroxivitamina D (25-hidroxicolecalciferol), siendo esta de 20.13 con una desviación estándar de 8.69.

Tabla 1. Descripción de los pacientes con miastenia gravis incluidos en el estudio (n = 31).

Característica	Valor
Edad, media (DE), años	51.84 (19.74)
Edad, mediana (rango), años	47.0 (21-86)
Género femenino, n (%)	22 (71.0)
Clasificación de Osserman, n (%)	
I	2 (6.5)
IIa	15 (48.4)
IIb	10 (32.3)
III	3 (9.7)
IV	1 (3.2)
Timectomía, n (%)	22 (71.0)
>15 años desde el diagnóstico, n (%)	9 (29.0)
Coexistencia de otras enfermedades autoinmunes, n (%)	16 (51.6)
Piridostigmina, n (%)	26 (83.9)
Prednisona, n (%)	9 (29.0)
Otros inmunosupresores, n (%)	18 (58.1)
Anticuerpos anti-AChR detectables, n (%)	21 (75.0)
Anticuerpos anti-AChR, media (DE), nM/L	127.63 (244.58)
25-hidroxicolecalciferol, media (DE), ng/ml	20.13 (8.69)

En la tabla 2 se comparan algunas características de los pacientes incluidos en el estudio con diagnóstico de miastenia gravis y sus respectivos controles, que en este caso se asignaron 3 controles pareados por edad y sexo para cada caso. Quedando entonces con 31 casos y 93 controles. La edad media para ambos grupos fue 51.84 con una desviación estándar de 19.98; ocupando el género femenino el 71%.

Se aplicó a las dos muestras, tanto la de casos como la de controles la prueba U de Mann-Whitney, para comprobar la heterogeneidad entre ambas muestras en cuánto a los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D, encontrando que en el grupo de casos tenían una media de 20.13 vs 28.62 en el grupo de los controles, con un valor de $P < 0.001$ considerándose estadísticamente significativo, por lo que parece ser que efectivamente los niveles de 25-hidroxivitamina D tienden a ser más bajos en los pacientes con miastenia gravis que en individuos sin enfermedades autoinmunes. Además, se calculó la mediana de estos niveles medidos, siendo de 18 para el grupo de casos vs 28.9 para el grupo control, mostrando un valor de $P 0.001$, siendo también significativo.

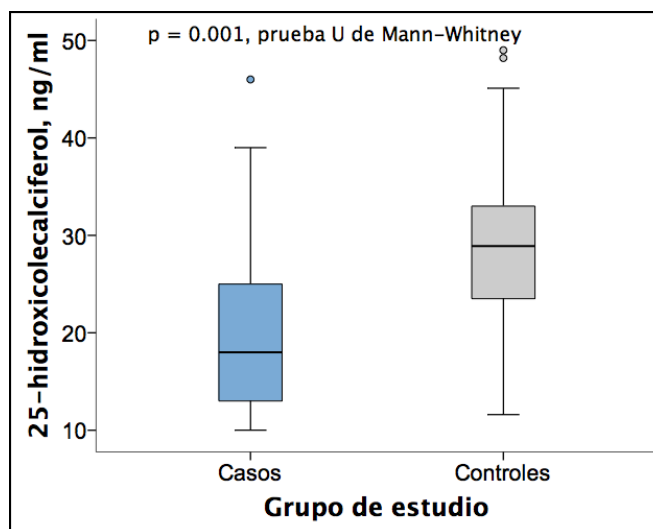
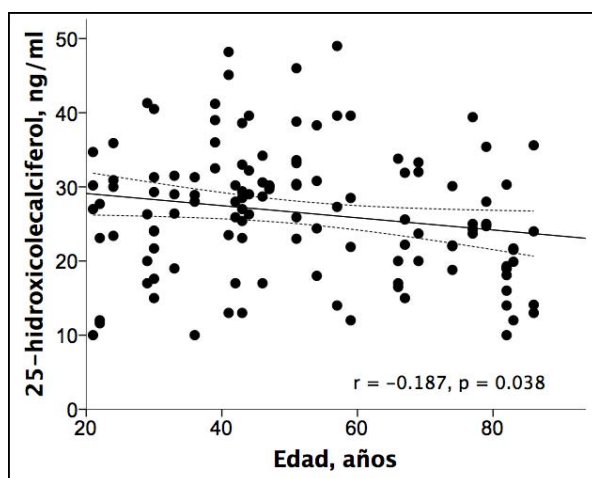


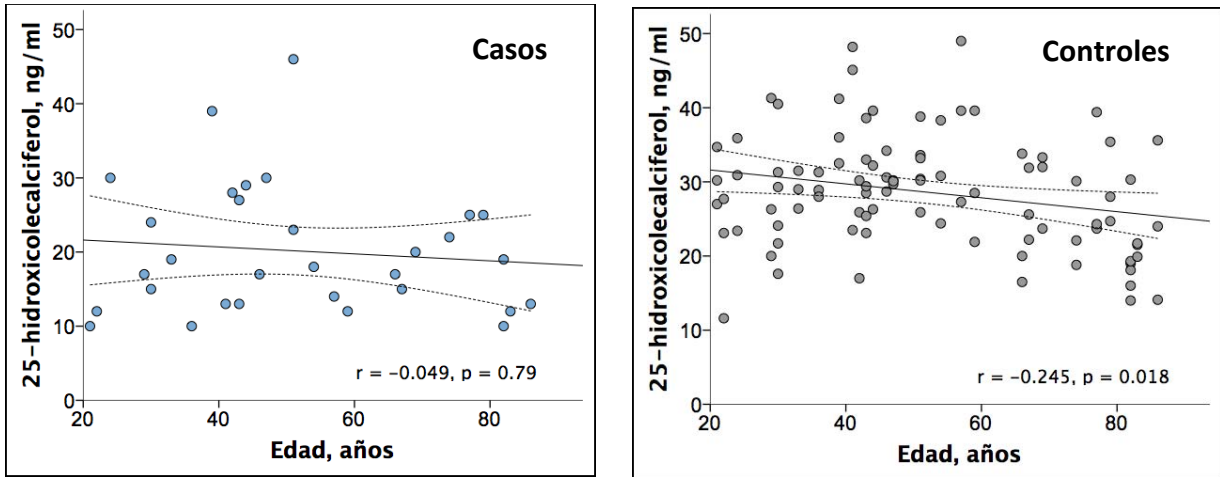
Tabla 2. Comparación de algunas características de los casos y sus respectivos controles (n = 24)

Característica	Casos (n = 31)	Controles (n = 93)	Valor de p
Edad, media (DE), años	51.84 (19.98)	51.84 (19.98)	1.00
Edad, mediana (rango), años	47 (21- 86)	47 (21- 86)	1.00
Género femenino, n (%)	22 (71)	66 (71)	1.00
25-hidroxicolecalciferol, media (DE), ng/ml	20.13 (8.69)	28.62 (7.57)	< 0.001
25-hidroxicolecalciferol, mediana (rango), ng/ml	18.00 (10.0 – 46.0)	28.90 (11.6 – 49.0)	0.001

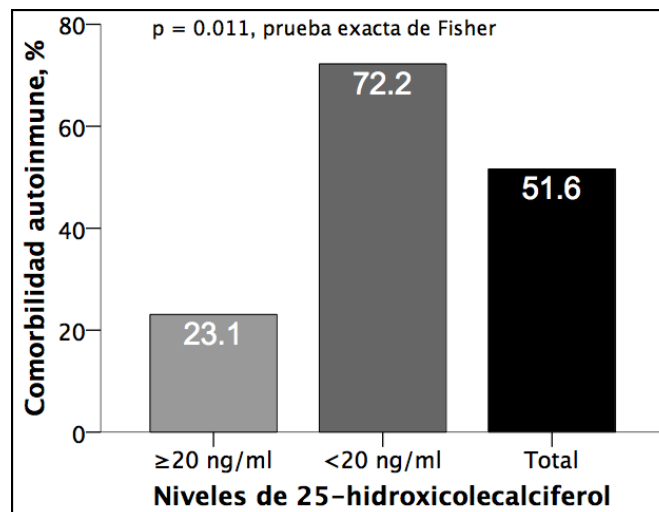


Incluyendo el total de pacientes, tanto casos como controles que corresponde a 124 individuos, de forma gráfica se muestra en el diagrama de dispersión los valores de la variable independiente que corresponde a la edad en el eje horizontal y de la variable dependiente que corresponde a los niveles de 25-hidroxivitamina D en el eje vertical. Observando un coeficiente de correlación de Pearson de -0.187 ($p = 0.038$) demostrando una correlación negativa entre ambas variables, por lo que entre mayor edad niveles más bajos de 25-hidroxivitamina D.

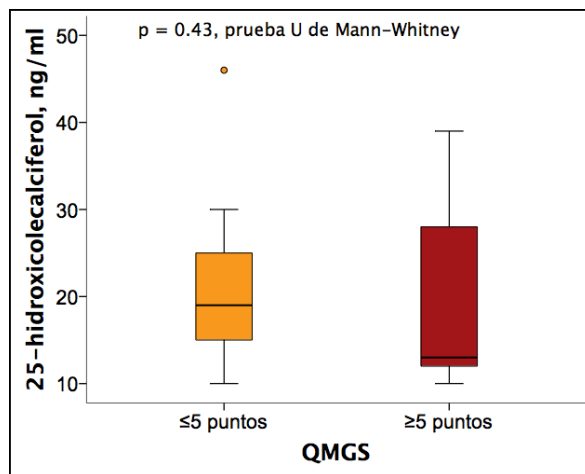
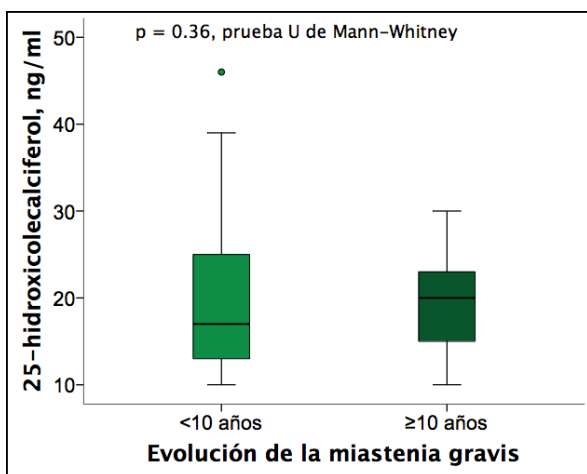
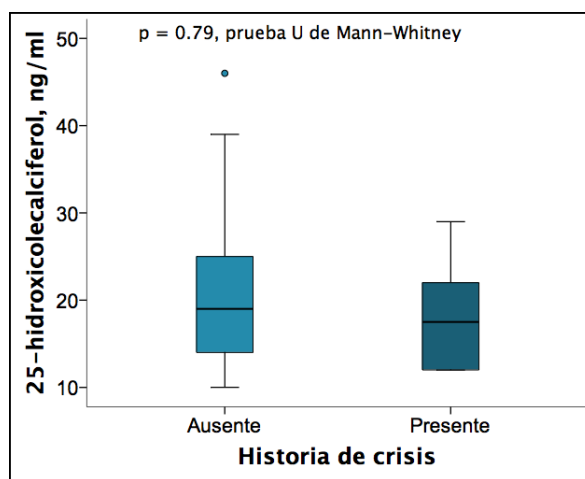
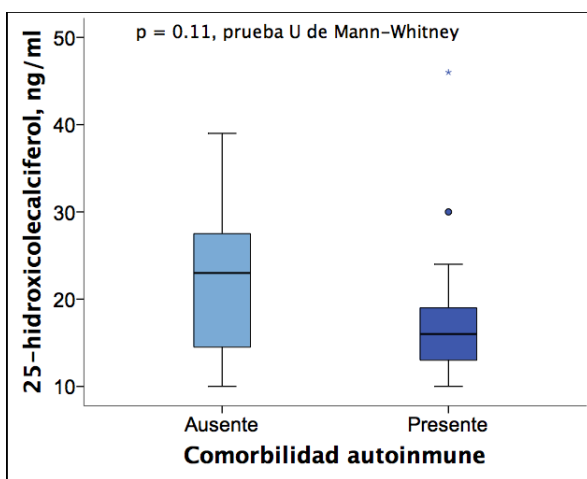
Al realizar el mismo tipo de análisis que en la gráfica previa, pero únicamente con los 31 pacientes del grupo de casos, se observa que el coeficiente de correlación de Pearson es de -0.049 ($p = 0.79$) acercándose al valor cero, por lo que se puede inferir que la edad no es una variable que esté en estrecha relación con los niveles de 25-hidroxivitamina D en este grupo de pacientes. Posteriormente, se realizó este análisis en el grupo control, en el que el coeficiente de correlación de Pearson fue de -0.187 ($p = 0.038$), observando que en este grupo de pacientes si existe una correlación negativa entre la edad y los niveles de 25-hidroxivitamina D



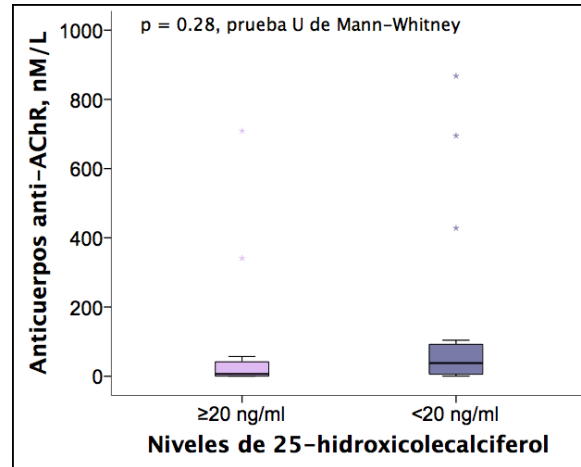
Al realizar el análisis de los niveles de 25-hidroxivitamina D y las comorbilidades autoinmunes en el grupo de pacientes con diagnóstico de miastenia gravis, se observó que el 23.1% de los sujetos que tenían una determinación sérica mayor o igual a 20 ng/ml presentaban alguna enfermedad autoinmune coexistente, mientras que un mayor porcentaje (72.2%) de los casos con niveles séricos menores a 20 ng/dl presentaban comorbilidad autoinmune. Con un valor de p de 0.011 alcanzando significancia estadística.



Utilizando la prueba U de Mann-Whitney para el análisis de los datos en el grupo de casos y representado por un diagrama de caja, para comprobar la heterogeneidad de los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D en cuanto a la presencia o ausencia de comorbilidad autoinmune, se observó que en pacientes con enfermedad autoinmune coexistente la mediana de niveles de 25-hidroxivitamina D fue menor que en quienes no presentaban comorbilidad autoinmune, a excepción de un paciente con valor atípico que se muestra en la gráfica ($p = 0.11$). Al realizar este mismo análisis pero ahora en relación a la historia de crisis miasténicas, observamos que quienes habían presentado esta complicación tuvieron tendencia a tener los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D más bajos que quienes nunca habían tenido alguna crisis de la enfermedad ($p = 0.79$). En relación a la evolución de la MG se observa exactamente la misma tendencia que con las variables previas en el caso de los pacientes que tenían más de 10 años de su diagnóstico ($p = 0.16$). Cuando se realiza el análisis en base al puntaje de QMGS se observa así mismo que aunque el rango entre los dos brazos de la caja es más amplio en quienes tenían un puntaje mayor a 5, la mediana continúa siendo menor en estos casos que en quienes un puntaje igual o menor a 5 ($p = 0.43$).



Por último, en este diagrama de caja se observa que los pacientes con miastenia gravis que presentaban un nivel de 25-hidroxivitamina D menor a 20 ng/dl tendieron a tener niveles de anticuerpos anti-AChR más altos, aunque no alcanzó significancia estadística ($p = 0.28$)



XI. DISCUSIÓN

La miastenia gravis es una enfermedad neuromuscular autoinmune dependiente de células T y causada por anticuerpos dirigidos contra las proteínas o receptores de la unión neuromuscular. Así, se considera que las células T reguladoras (Treg) juegan un papel importante en el inicio y curso de la enfermedad, ya que proveen un mecanismo que mantiene la autotolerancia y previene la respuesta autoinmune, pues regulan la respuesta inmune de las células Th y B, a través de la supresión de la activación, proliferación y producción de citocinas de las células autorreactivas. Por otra parte, la vitamina D ejerce un efecto inmunorregulador que se considera reside en el incremento de la cantidad de células T reguladoras y en mantener la función muscular a través de su efecto sobre el receptor de vitamina D en el músculo.

Según lo que conocemos de la literatura médica indizada, existen solo dos estudios a nivel mundial y ninguno en la República Mexicana sobre la determinación de los niveles de vitamina D en enfermedades neuromusculares autoinmunes como la miastenia gravis, por lo que aún se conoce poco sobre esta relación. Aunque se ha investigado en algunas otras enfermedades tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple, en las que se ha propuesto existe una asociación entre los niveles de vitamina D con la actividad autoinmune, llegando incluso a utilizar la vitamina D como un marcador de actividad de la enfermedad y como tratamiento.

En este estudio en el que se incluyeron un total de 124 pacientes, conformando 31 el grupo de casos y 93 el grupo control. Se observó que un alto número de pacientes incluidos tanto en los casos como en los controles, presentaban deficiencia e insuficiencia de 25-hidroxivitamina D, lo cual permite poca comparabilidad entre ambos grupos. Dentro del grupo de casos donde se encontraban los pacientes con diagnóstico de miastenia gravis más del setenta por ciento fueron mujeres, con una media de edad cercana a los 50 años, esto debido a que es una enfermedad que afecta principalmente a mujeres, hasta tres veces más que a los hombres antes de los 40 años de edad.

La prevalencia de la deficiencia de 25-hidroxivitamina D fue mayor en los pacientes con miastenia gravis, encontrando niveles inferiores a los límites de normalidad establecidos en el laboratorio del Instituto. Así mismo, el status de la concentración sanguínea de dicha vitamina en la mayoría de ellos fue más bajo que en el grupo control, alcanzando significancia estadística con un valor de $p < 0.001$, por lo que se cumple la hipótesis planteada al inicio del estudio que los pacientes con miastenia gravis presentan niveles séricos más bajos de 25-hidroxivitamina D, en comparación con personas sin esta enfermedad.

Se evaluó además si existía alguna asociación entre el status de los niveles de 25-hidroxivitamina D y la expresión clínica de la enfermedad. Por lo que luego de realizado el análisis estadístico de los datos recabados se observó que en los pacientes con miastenia gravis existe una relación entre el serostatus de 25-hidroxivitamina D tanto con la coexistencia de otras enfermedades autoinmunes, como tener historia de crisis miasténicas, una evolución mayor a 10 años desde el diagnóstico de la enfermedad, un QMGS mayor a 5 puntos y niveles elevados de anticuerpos anti-AChR. Aunque en este estudio todas estas variables no alcanzaron significancia estadística para confirmar la segunda hipótesis planteada al inicio, en la que se postulaba que los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D serían inferiores en los pacientes con una peor condición clínica y mayores títulos de anticuerpos anti-AChR. Si presentaron una tendencia a estar presentes en los pacientes con un nivel de 25-hidroxivitamina D más bajo.

XII. CONCLUSIONES

La prevalencia de deficiencia e insuficiencia de 25-hidrovitamina D es mayor en los pacientes con diagnóstico de miastenia gravis, en relación a los pacientes con otras patologías no autoinmunes. Aunque en este estudio no se alcanzó significancia estadística, consideramos en parte atribuible al pequeño tamaño de muestra, para postular de manera contundente la asociación entre el status de los niveles de 25-hidroxivitamina D y la expresión clínica de la miastenia gravis. Si podemos mencionar que existe una tendencia a que los niveles de 25-hidroxivitamina D se encuentren más bajos en los pacientes en quienes coexisten otras enfermedades autoinmunes, así como otros factores entre los que se incluyen tener historia de crisis miasténicas, una evolución

mayor a 10 años desde el diagnóstico de la enfermedad, un QMGS mayor a 5 puntos y niveles elevados de anticuerpos anti-AChR.

Por lo mencionado anteriormente, es entonces importante monitorizar este parámetro de serostatus de 25-hidroxivitamina D en los pacientes con diagnóstico de miastenia gravis, para considerar su suplementación en caso de encontrarse bajos y de esa manera incidir en la evolución de la enfermedad. Aunque en este estudio no se pudo alcanzar significancia estadística para relacionar el status de los niveles de 25-hidroxivitamina D y la expresión clínica de esta enfermedad, se sugiere realizar otros estudios de investigación a futuro para confirmar el potencial papel que juega la vitamina D como inmunorregulador y su efecto sobre la función muscular en los pacientes con MG, ya que al momento es aún poco lo que se conoce sobre este tema y hace falta explorarlo más a profundidad.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alahgholi-Hajibehzad M, Kasapoglu P, Jafari R, Rezaei N. The role of T regulatory cells in immunopathogenesis of myasthenia gravis: implications for therapeutics. *Expert Reviews Clinical Immunology* 2015; 11(7):859-870
2. Antico A, Tampoia M, Tozzoli R, Bizarro N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmunity Reviews* 2012; 12:127-136
3. Askmark H, Haggard L, Nygren I, Punga R. Vitamin D deficiency in patients with myasthenia gravis and improvement of fatigue after supplementation of vitamin D3: a pilot study. *European Journal of Neurology* 2012; 19:1554-1560
4. Badireddi S, Bercher A, Holder J, Mireles-Cabodevila E. Vitamin D deficiency in patients with neuromuscular diseases with chronic respiratory failure. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2014; 38:602-607
5. Berrih-Aknin S, Le Panse R. Myasthenia gravis: A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms. *Journal of Autoimmunity* 2014; 52:90-100
6. Cacho-Díaz B, Ruano-Calderón IA, Valdez-Ferrer SI, et al. Miastenia gravis y sus comorbilidades. *Revista Mexicana de Neurociencias* 2006; 7:449-450
7. Conti-Fine BM, Bellone M, Howard JF Jr, Protti MP. *Myasthenia Gravis: The Immunobiology of an Autoimmune Disease*. Austin, TX, Neuroscience Intelligence Unit, RG Landes, 1997

8. Echeverría-Galindo G, Mardueño-Ibarra M, Gonzalez-Jaime J, et al. Miastenia gravis en un hospital de referencia del occidente de México. *Revista Mexicana de Neurociencias* 2008; 9:278-282
9. Garcia L, King K, Ferrini M, Norris K, Artaza J. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2011; 152:2976-2986
10. Grob D, Brunner NG, Namba T. The natural course of myasthenia gravis and the effect of various therapeutic measures. *Annals NY Academy of Sciences* 1981; 377:652–669
11. Hewison M. Vitamin D and immune function: an overview. *Proceedings of the Nutrition Society* 2012; 71:50-61
12. Kaminski HJ. *Myasthenia gravis and related disorders*. Totowa, New Jersey. Humana Press 2003; 3:53-92
13. Larner AJ. The place of the ice pack test in the diagnosis of myasthenia gravis. *International Journal of Clinical Practice* 2004; 58(9):887-8
14. Lisak RP, Laramore C, Levinson AI, Zweiman B, Moskovitz AR. Suppressor T cells in myasthenia gravis and antibodies to acetylcholine receptor. *Annals of Neurology* 1986; 19:87–89.
15. Lisak RP, Laramore C, Levinson AI, et al. In vitro synthesis of antibodies to acetylcholine receptor by peripheral blood cells: role of suppressor T cells in normal subjects. *Neurology* 1984; 34:802–805
16. Matsuda M, Dohi-Iijima N, Nakamura A et al. Increase in incidence of elderly-onset patients with myasthenia gravis in Nagano Prefecture, Japan. *Internal Medicine* 2005; 44:572–7
17. Mokhtarian F, Pino M, Ofosu-Appiah W, Grob D. Phenotypic and functional characterization of T cells from patients with myasthenia gravis. *Journal of Clinical Investigation* 1990; 86:2099–2108
18. Pakzad Z, Aziz T, Oger J. Increasing incidence of myasthenia gravis among elderly in British Columbia, Canada. *Neurology* 2011; 76:1526–8
19. Pacuzzi R. The edrophonium test. *Seminar in Neurology* 2003; 23(1):83-8

20. Prietl B, Pilz S, Wolf M, Tomaschitz A, Obermayer-Pietsch B, Graninger W, Pieber T. Vitamin D supplementation and regulatory T cells in apparently healthy subjects: vitamin D treatment for autoimmune diseases?. *Israel Medical Association Journal* 2010; 12:136-139
21. Oosterhuis HJGH. Observations of the natural history of myasthenia gravis and the effect of thymectomy. *Annals NY Academy of Sciences* 1981; 377:678–689
22. Oosterhuis HJGH. The natural course of myasthenia gravis: a longterm follow-up study. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry* 1989; 52:1121–1127
23. Pallaver F, Riviera AP, Piffer S et al. Change in myasthenia gravis epidemiology in Trento, Italy, after twenty years. *Neuroepidemiology* 2011; 36:282–7
24. Protti MP, Manfredi AA, Straub C, Howard JF Jr, Conti-Tronconi BM. CD4+ T cell response to human acetylcholine receptor subunit correlates with myasthenia gravis severity. A study with synthetic peptides. *Journal of Immunology* 1990; 144:1276–1281
25. Robertson NP, Deans J, Compston DAS. Myasthenia gravis: a population based epidemiological study in Cambridgeshire, England. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry* 1998; 65:492–496
26. Sanders DB, Massey JM. Clinical features of myasthenia gravis. *Handbook of Clinical Neurology* 2008; 7:229-252
27. Sieb JP. Myasthenia gravis: an update for the clinician. *Clinical & Experimental Immunology* 2013; 175:408-418
28. Stalberg E, Trontelj JV, Sanders DB. Single fiber EMG. Ed 3. Edshagen Publishing House, Uppsala, Sweden, 2010
29. Wang ZY, Diethelm-Okita B, Okita DK, et al. T cell recognition of muscle acetylcholine receptor in ocular myasthenia gravis. *Journal of Neuroimmunology* 2000; 108:29–39
30. Wang ZY, Okita DK, Howard J Jr, Conti-Fine BM. T-cell recognition of muscle acetylcholine receptor subunits in generalized and ocular myasthenia gravis. *Neurology* 1998; 50:1045–1054
31. Wong V, Hawkins BR, Yu YL. Myasthenia gravis in Hong Kong Chinese. *Acta Neurológica Scandinava* 1992; 86:68–72

32. Yuen MH, Protti MP, Diethelm-Okita B, et al. Immunoregulatory CD8+ cells recognize antigen-activated CD4+ cells in myasthenia gravis patients and in healthy controls. *Journal of Immunology* 1995; 154:1508–1520.