

Miastenia gravis seronegativa: revisión de la literatura

Seronegative Myasthenia Gravis: A Literature Review

Felipe Pretelt (+ 2016) (1), Sonia Patricia Millán (2), Mónica María Novoa (3)

En memoria del doctor Felipe Pretelt, quien demostró amor y vocación por todos sus pacientes; cariño y paciencia por sus estudiantes.

RESUMEN

En 1976 se identificaron varios anticuerpos dirigidos contra el receptor de acetil colina en el suero de los pacientes con miastenia gravis (MG). Sin embargo, luego de unos años, se evidenció que aproximadamente el 20 % de los pacientes con MG generalizada y con evidencia electrofisiológica de un trastorno de la unión neuromuscular, no expresan dichos anticuerpos por radioinmunoensayo (RIA); éstos constituyen los casos de miastenia gravis seronegativa (MGSN). El diagnóstico en estos pacientes es difícil, dada la ausencia de autoanticuerpos detectables en suero y la falta de estudios neurofisiológicos sensibles. Recientemente un nuevo método basado en ensayos celulares muestra un aumento significativo en la detección de miastenia seropositiva, en casos diagnosticados previamente como seronegativos. Este artículo pretende dar un abordaje sobre la fisiopatología de la miastenia gravis seronegativa, así como una actualización de los últimos avances sobre su diagnóstico. También busca hacer una revisión sobre el contexto general actual de esta patología en Colombia.

PALABRAS CLAVE: enfermedades autoinmunes del sistema nervioso, enfermedades de la unión neuromuscular, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades neuromusculares, miastenia gravis, autoinmune, experimental (DeCS).

SUMMARY

In 1976 antibodies against acetyl-choline receptor were identified on the serum of patients with myasthenia gravis. However, some years later, it became clear that about 20% of patients with generalized MG and an electro physiologic disorder on the neuromuscular junction did not express these antibodies by radioimmunoassay (RIPA). These cases represent seronegative myasthenia gravis (SNMG). The diagnosis of these patients is difficult, given the absence of detectable autoantibodies on serum and the lack of sensitive neurophysiologic tests. Recently, a new method based on cellular assays shows an increase on detection of seropositive MG from cases, which were initially diagnosed as seronegative. This article reviews the physiopathology of seronegative MG and gives an update on the latest advances concerning its diagnosis. It also hopes to approach the current general context of the illness in Colombia.

KEY WORDS: Autoimmune Diseases of the Nervous System, Myasthenia Gravis, Myasthenia Gravis, Autoimmune, Experimental, Nervous System Diseases, Neuromuscular Diseases, Neuromuscular Junction Diseases (MeSH)..

- (1) Médico cirujano, especialista en Neurología; jefe Unidad de Neurología, Clínica del Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, Colombia
- (2) Médica cirujana, especialista en Neurología, Neurofisiología y Medicina Familiar; Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, Colombia
- (3) Estudiante de Medicina IX semestre, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Recibido: 22/12/16. Aceptado: 20/01/17.

Correspondencia: Mónica María Novoa, monica.novoa@javeriana.edu.co

INTRODUCCIÓN

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad de origen autoinmune, caracterizada por debilidad y fatiga muscular. En 1960 se propuso su etiología inmune y en la década de los setenta se logró aislar el anticuerpo contra los receptores de acetil colina de la placa neuromuscular (anti-AChR). Este anticuerpo es una inmunoglobulina tipo G, que produce un cambio inflamatorio, disminuye el potencial de transmisión neuromuscular y genera síntomas característicos en el paciente. Se estima que en el 80-90 % de la población con miastenia generalizada se detecta anti-AChR por radioinmunoensayo (RIA). Los demás pacientes seronegativos cursan con un cuadro clínico típico de MG pero tienen un perfil diferente en cuanto a edad de presentación, curso, severidad, grupos musculares afectados y respuesta clínica a los tratamientos convencionales.

En el año 2001 se aisló el anticuerpo contra la kinasa específica del músculo (MuSK) por RIA en el suero de pacientes con miastenia gravis seronegativa. Se trata de un polipéptido neural necesario para la generación de la sinapsis. En la actualidad, este es el anticuerpo más estudiado, pero se han citado otro tipo de proteínas probablemente también relacionadas; dentro de las más nombradas están: agrina, lipoproteína 4 (LPR4), contactina, titina y colágeno Q (1, 2). El término miastenia doblemente seronegativa aplica para aquellos casos en donde no existen anticuerpos contra el receptor de acetil colina, ni contra MuSK (3). La miastenia gravis seronegativa (MGSN) es un reto para la medicina debido a la ausencia de un patrón de oro diagnóstico.

EPIDEMIOLOGÍA

Entre el 10 y el 20 % de los pacientes con miastenia son seronegativos para anti-AChR por RIA. En miastenia ocular pura la proporción de pacientes seronegativos es del 50 % (3).

Del total de pacientes seronegativos, hasta el 70 % expresan anticuerpos anti – MuSK (1). La variabilidad de expresión de MuSK se debe a diferencias étnicas y a determinantes ambientales, algunos estudios sugieren una mayor prevalencia en países del Mediterráneo (4).

En general, la miastenia autoinmune es más común en hombres, sin embargo, el fenotipo anti MuSK es más frecuente en mujeres. En contraste a la miastenia seropositiva, el timoma es un hallazgo infrecuente en MGSN (5, 6).

FISIOPATOLOGÍA

El MuSK es una proteína transmembrana presente en la unión neuromuscular. Junto con la lipoproteína LRP4 son parte del receptor para agrina, un proteoglicano de la matriz derivado de las motoneuronas, necesario para la sinapsis (7).

La unión agrina - MuSK genera un dímero que facilita la expresión de unas proteínas del citoesqueleto denominadas RAPsyn, que a su vez, facilitan el agrupamiento selectivo de los receptores de acetil colina intracelular y a nivel de la superficie postsináptica. Por consiguiente, el MuSK juega un papel en el anclaje de la acetil colina en la membrana postsináptica en modelos in vitro (7).

El anticuerpo anti-AChR es una inmunoglobulina tipo G (IgG) que tiene la propiedad de desencadenar una respuesta del complemento con depósito de complejos inmunes a nivel celular y la destrucción de la membrana postsináptica, hallazgos visibles en biopsia muscular. Por otro lado, los anticuerpos anti-MuSK son predominantemente de tipo IgG 4 y no activan la vía clásica del complemento (8–10). Esto explicaría los pobres hallazgos en la biopsia muscular de pacientes seronegativos con sintomatología florida, descritos en algunos estudios (7). En la población con expresión anti-MuSK hay disminución de la activación de agrina y de la disponibilidad de receptores de acetil colina en los miotúbulos (7). El aumento de niveles séricos de anti-MuSK se correlaciona con la gravedad de los síntomas de estos pacientes.

Existen dos tipos de anti-MuSK: mono y divalentes. Experimentos in vitro sugieren que los anticuerpos divalentes actúan induciendo una internalización de MuSK y produciendo una regulación a la baja de los mismos, mientras que los anticuerpos monovalentes actúan inhibiendo la autofosforilación de MuSK por agrina y su unión a LRP4 (7). En conclusión, los anticuerpos monovalentes inhiben la conformación del complejo agrina – LPR4, la activación de rapsina y por ende el agrupamiento de los receptores de acetil colina sobre la membrana celular (11).

El mecanismo de regulación para producción de anti MuSK aún es incierto. Se ha evidenciado una relación entre la producción de IgG4, citoquinas liberadas por linfocitos T colaboradores e interleuquinas 4 y 10; sin embargo, este mecanismo no está completamente dilucidado (7). También existen estudios en los cuales se han descrito anticuerpos contra contactina, titina, LPR4, DOK 7, entre otros; nuevamente sin claridad sobre el mecanismo fisiopatológico que explica la génesis de la enfermedad (3).

PRESENTACIÓN CLÍNICA

Clínicamente la miastenia se divide en tres categorías: ocular, generalizada con síntomas bulbares y generalizada con síntomas apendiculares (12).

El fenotipo anti MuSK es distintivo: los síntomas tienen un inicio y curso subagudos con un franco predominio bulbar; los hallazgos más frecuentes son diplopía, disartria, voz nasal, disfagia, debilidad facial (principalmente el músculo orbicular oris, oculi y buccinador) y de la musculatura

cervical (13). La disfunción bulbar por lo general es grave y puede asociarse a insuficiencia respiratoria, caracterizada por ser refractaria a terapia inmunosupresora (14, 15). La atrofia de músculos faciales y de la lengua son comunes (7, 16). Hay afectación de la musculatura extraocular como primera manifestación en el 59 % de los casos (ptosis palpebral y oftalmoplejía); seguido de debilidad en músculos con inervación bulbopontina (29 %); y debilidad en musculatura facial, cervical y de extremidades (12 %). Al momento de máxima sintomatología, la afección es generalizada en un 68 %, puramente ocular en un 25 %, oculobulbar en un 5 % y restringida a extremidades en un 2 % (13).

Al realizar seguimiento clínico con escalas de medición como la escala modificada de Osserman y la clasificación clínica de la Fundación Miastenia Gravis de América, algunos estudios muestran un curso más agresivo en la MNSN que en la doble seronegativa o en la seropositiva (6, 17). Con el paso de los años, los síntomas tienden a estabilizarse sin una remisión completa, sin embargo, presentan mayor número de crisis miasténicas con necesidad de asistencia ventilatoria. La dificultad para la deglución, el impedimento al movimiento de la musculatura faríngea y la parálisis parcial de las cuerdas vocales predisponen al paciente a crisis respiratorias severas (13).

En cuanto a su evolución, no tiene mejoría clínica con timectomía. Muestra pobre remisión de síntomas con uso de inhibidores de acetilcolinesterasa, y en cambio estos últimos parecen predisponer a crisis colinérgicas (18–20); lo anterior podría eventualmente explicarse debido a que los anticuerpos anti-MuSK interfieren con la unión de la acetil colina a la placa neuromuscular, generando un efecto de toxicidad sistémica.

En general, la miastenia doble seronegativa muestra un patrón de enfermedad más heterogéneo con mayor afectación de las extremidades (en algunos estudios indistinguible de una miastenia seropositiva), con mejor respuesta al tratamiento convencional (1, 13).

Recientemente se ha descrito el fenotipo contra anticuerpos anti-cortactina, el cual clínicamente genera miastenia ocular en el 50 % de los casos y generalizada en el 50 % restante. Así mismo, estos pacientes cursan con formas más leves, una edad de inicio más temprana y el compromiso bulbar es raro (3).

APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA

El diagnóstico de la miastenia seronegativa ha sido problemático dada la carencia de una prueba de oro estándar y que muchas pruebas utilizadas no tienen buen rendimiento.

Pruebas farmacológicas

La prueba con edrofonio (inhibidor de la acetilcolinesterasa) tiene una sensibilidad del 90 % en la MGSP pero sólo un 50 % en la MGSN con expresión anti MuSK. Un resultado negativo no descarta la condición (21).

Pruebas neurofisiológicas

La neuroconducción en extremidades de pacientes con miastenia autoinmune es con frecuencia normal (22, 23).

Por este motivo, es recomendable realizar prueba de estímulo repetitivo con el objeto de demostrar electrocremento significativo (mayor del 10 %). Por lo general, durante la prueba tienden a explorarse nervios de miembros superiores. Sin embargo, como se explicó previamente en la miastenia autoinmune seronegativa, el compromiso apendicular es más raro y menos severo, siendo más evidente la afección óculo-bulbar. En estos casos, esta prueba se puede realizar en orbicular de los ojos.

De igual manera la electromiografía de fibra única es una herramienta diagnóstica sobresaliente en estos casos, debido a que se altera casi en un 100 %. Dentro de las limitantes de esta prueba se encuentra el tiempo que toma la realización de la misma, la duración del estudio (1 hora o más) y que debe ser practicada por personal con un adecuado entrenamiento (11, 13, 21).

ENSAYOS CELULARES

Hasta hace poco se consideraban los radioinmunoensayos (RIA) como las pruebas más sensibles para detección de anti-AChR.

Desde 1976 algunos autores se interrogaban sobre la sensibilidad del estudio para detectar anticuerpos en casos de miastenia seronegativa (12). Para determinar esto, un grupo de investigación de la Universidad de Oxford implementó los ensayos celulares (CBA) para comparar su rendimiento con la prueba convencional de RIA en la detección de anti-AChR en pacientes dobles seronegativos (sin expresión anti-AChR ni anti-MuSK) (1, 12, 24). La prueba consiste en la transfección de células embrionarias humanas de riñón (HKC) con genes complementarios que codifican la expresión de receptores de acetil colina en su superficie y la proteína de anclaje, rapsina. Los anti AChR en el suero del paciente con sospecha de MG se unen a los receptores de acetilcolina de las células renales embrionarias y esta unión puede ser visualizada a través de inmunofluorescencia indirecta (1). Esta metodología permite la detección de anti-AChR en un ambiente de membrana celular natural y

en bajas concentraciones (12). Como resultado, la prueba muestra una seropositividad del 38 % de los pacientes que fueron inicialmente seronegativos por RIA, con 100 % de especificidad, evidenciando la superioridad de la prueba para la confirmación diagnóstica de la miastenia gravis. El grupo liderado por Chang T. apoya los resultados anteriores: encontró que el CBA mejora la capacidad diagnóstica del RIA para anti-AChR en un 21 % y de anti-MuSK en un 77 % (25). Tsonis AI et al evidenciaron detección del 13 % de anti-MuSK en pacientes inicialmente triple seronegativos (AChR/MuSK/LRP4) por RIPA (26). En Francia, Devic P et al mostraron mediante ensayos celulares mayor detección de anti-AChR agrupados en un grupo de pacientes con MGSN (27).

Los autoanticuerpos detectados por CBA tienen mecanismos patogénicos consistentes en lisis mediada por complemento como sucede con los anti-AChR (1). El grupo de investigadores planteó la posibilidad de que ese 38 % de los pacientes diagnosticados inicialmente con MGSN por radioinmunoanálisis, son en realidad pacientes con expresión anti-AChR, sólo que en menor concentración o bien, con menor afinidad por los receptores de acetilcolina. El estudio también mostró que esa población seropositiva por CBA posee características particulares como: un patrón de inicio de enfermedad a edad temprana (edad prepuberal y peri puberal), síntomas oculares, remisión completa de los síntomas con terapia farmacológica y mejor pronóstico (1).

La CBA está intentando implementarse como método diagnóstico para diferentes tipos de enfermedades de origen autoinmune, dado su gran éxito en la detección de autoanticuerpos. Sin embargo, tiene limitaciones debido a su elevado costo y a la difícil consecución de cepas celulares (28).

TRATAMIENTO

La miastenia seronegativa con expresión anti-MuSK tiene un tratamiento limitado dada su pobre respuesta a terapias convencionales (inhibidores de colinesterasa) (29). Responden mejor a los corticosteroides, la ciclosporina A, rituximab y a plasmaféresis. Sin embargo, se considera este tratamiento poco satisfactorio partiendo de dos hechos: incluso altas dosis no previenen de un deterioro de la enfermedad dado por crisis miasténicas recurrentes y el uso constante de inmunosupresores genera síntomas bulbares y craneales permanentes, principalmente debilidad facial y disartria, posiblemente secundario a una atrofia lingual y faríngea (13, 30).

En la MGSN sin expresión anti-MuSK o doble seronegativa, (quienes tienden a manifestar una clínica más leve) es posible lograr control, incluso remisión de síntomas con terapia farmacológica como inhibidores de colinesterasa o terapia inmunosupresora con corticosteroides (1).

CONTEXTO EN COLOMBIA

En Colombia, el diagnóstico de la miastenia se realiza inicialmente con base en el interrogatorio y el examen físico. Los hallazgos de fatigabilidad y debilidad fluctuante, son indicativos de trastorno en la unión neuromuscular. La realización de pruebas sencillas en el consultorio como la prueba del hielo y de fatigabilidad, apoyan el diagnóstico.

Posteriormente, se debe solicitar la prueba de estímulo repetitivo (test de Lambert). Cuando esta prueba es negativa y persiste una alta sospecha clínica de miastenia se debe realizar electromiografía de fibra única. Es preciso señalar que cada día en el país se cuenta con más centros especializados en la realización de fibra única, especialmente empleando la técnica con aguja concéntrica.

Colombia cuenta con detección de anticuerpos anti-AChR y recientemente se cuenta con la opción de realizar anticuerpos anti-MuSK. Para ambos estudios, las pruebas son enviadas al exterior, lo cual limita su acceso y por ende dificulta la diferenciación de los casos seropositivos de los negativos.

Las restricciones económicas en el sistema de salud no permiten a los médicos e investigadores hacer un estudio exhaustivo ideal. En casos donde no hay claridad sobre el diagnóstico puede solicitarse la medición de anti-AChR. La detección de anti-MuSK se hace cuando las indicaciones son muy específicas, generalmente cuando los anti AChR no son detectables y hay fenotipo bulbar.

En relación al tratamiento, en general, los pacientes colombianos con miastenia tanto seropositivos como seronegativos reciben inicialmente un mismo tratamiento sin discriminar entre medicamentos o dosis de los mismos. Uno de los mayores retos a nivel científico clínico es mejorar el diagnóstico de pacientes seronegativos. Una opción sencilla para aumentar la detección de esta enfermedad sería incluir el estímulo repetitivo facial en pacientes con miastenia ocular o bulbar. Esto serviría para identificar los casos de manera más temprana, antes de la generalización de los síntomas.

CONCLUSIÓN

La miastenia gravis seronegativa (MGSN) se caracteriza por la ausencia de anticuerpos anti receptores de acetil colina (anti-AChR) detectables en suero por radioinmunoensayo (RIA). Su diagnóstico ha sido problemático dada la falta de una prueba de oro estándar. Recientemente, un nuevo método diagnóstico basado en ensayos celulares (CBA) supera al RIA en su rendimiento para la detección de anti-AChR, particularmente en pacientes con autoanticuerpos en bajas concentraciones o de baja afinidad por receptores de acetilcolina. Es posible, que en un futuro se implemente

la CBA como prueba de oro estándar en el diagnóstico de una MGSN.

En Colombia es necesario continuar estudiando la enfermedad con el objetivo de determinar sus características poblacionales, brindar tratamientos alternos que mejoren la calidad de vida de los pacientes y prevengan posibles crisis miasténicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Adriana Buitrago López, epidemióloga clínica del Departamento de Epidemiología Clínica y Bioestadística de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá, por su participación en la orientación y revisión de este artículo para su publicación.

REFERENCIAS

1. Cruz PMR, Al-Hajjar M, Huda S, Jacobson L, Woodhall M, Jayawant S, et al. Clinical Features and Diagnostic Usefulness of Antibodies to Clustered Acetylcholine Receptors in the Diagnosis of Seronegative Myasthenia Gravis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2015 [cited 2015 Dec 21]; 72(6):642-9. Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/data/Journals/NEUR/0/doi150011.pdf?v=635645517095870000>
2. Zisimopoulou P, Brenner T, Trakas N, Tzartos SJ. Serological diagnostics in myasthenia gravis based on novel assays and recently identified antigens. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):924–30.
3. Cortés-Vicente E, Gallardo E, Martínez MÁ, Díaz-Manera J, Querol L, Rojas-García R, et al. Clinical characteristics of patients with double-seronegative myasthenia gravis and antibodies to cortactin. *Jama Neurol*. 2016;73(9):1099–1104.
4. Boldingh MI, Maniaol AH, Brunborg C, Dekker L, Haldal AT, Lipka AF, et al. Geographical Distribution of Myasthenia Gravis in Northern Europe - Results from a Population-Based Study from Two Countries. *Neuroepidemiology*. 2015;44(4):221–31.
5. Oh SJ, Morgan MB, Lu L, Hatanaka Y, Hemmi S, Young A, et al. Different characteristic phenotypes according to antibody in myasthenia gravis. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2012;14(2):57–65.
6. Nemoto Y, Kuwabara S, Misawa S, Kawaguchi N, Hattori T, Takamori M, et al. Patterns and severity of neuromuscular transmission failure in seronegative myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(5):714–18.
7. Mori S, Shigemoto K. Mechanisms associated with the pathogenicity of antibodies against muscle-specific kinase in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):912–917.
8. Vincent A, Leite MI, Farrugia ME, Jacob S, Viegas S, Shiraishi H, et al. Myasthenia gravis seronegative for acetylcholine receptor antibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1132(1):84–92.
9. McConville J, Farrugia ME, Beeson D, Kishore U, Metcalfe R, Newsom-Davis J, et al. Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol*. 2004;55(4):580–4.
10. Vincent A, McCONVILLE J, Farrugia ME, Bowen J, Pleded P, Tang T, et al. Antibodies in Myasthenia Gravis and Related Disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;998(1):324–35.
11. Argov Z. Current approach to seronegative myasthenia. *J Neurol*. 2011;258(1):14–8.
12. Vernino S. Unraveling the Enigma of Seronegative Myasthenia Gravis. *JAMA Neurol*. 2015;72(6):630-31.
13. Blanco-Hernández T, Navarré-Gimeno A, Brocalero-Camacho A, Cervelló-Donderis A, López-Trigo J, Ortiz-Sánchez P, et al. [Methods for diagnosing seronegative myasthenia gravis]. *Rev Neurol*. 2007;46(6):360–364.
14. Aubert S, Salort-Campana E, Franques J, Uzenot D, Pouget J. Myasthénie séronégative et myasthénie avec anticorps anti-MuSK : une série rétrospective de 20 cas. *Rev Neurol (Paris)*. 2009;165(11):901–10.
15. Huang Y-C, Yeh J-H, Chiu H-C, Chen W-H. Clinical Characteristics of MuSK Antibody-positive Myasthenia Gravis in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2008;107(7):572–5.
16. Guptill JT, Sanders DB, Evoli A. Anti-musk antibody myasthenia gravis: Clinical findings and response to treatment in two large cohorts. *Muscle Nerve*. 2011;44(1):36–40.
17. Romi F, Aarli JA, Gilhus NE. Seronegative myasthenia gravis: disease severity and prognosis. *Eur J Neurol*. 2005;12(6):413–8.
18. Pasutharnchat N, Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Clinical manifestations of acetylcholine receptor antibody positive and negative myasthenia gravis. *J Med Assoc Thai Chotmaihet Thangphaet*. 2012;95(3):313–319.
19. Oh SJ. Muscle-Specific Receptor Tyrosine Kinase Antibody Positive Myasthenia Gravis Current Status. *J Clin Neurol*. 2009;5(2):53.
20. Lavrnjc D. The features of myasthenia gravis with autoantibodies to MuSK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(8):1099–102.
21. Evoli A, Padua L. Diagnosis and therapy of myasthenia gravis with antibodies to muscle-specific kinase. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):931–5.
22. Witoonpanich R, Dejthevaporn C, Sriphrapradang A, Pulkes T. Electrophysiological and immunological study in myasthenia gravis: Diagnostic sensitivity and correlation. *Clin Neurophysiol*. 2011;122(9):1873–7.
23. Muppidi S, Wolfe GI. Muscle-Specific Receptor Tyrosine Kinase Antibody-Positive and Seronegative Myasthenia Gravis. In: Pourmand R, editor. *Frontiers of Neurology and Neuroscience* [Internet]. Basel: KARGER; 2009 [cited 2015 Dec 21]. p. 109–19. Available from: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000212372>
24. Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in “seronegative” myasthenia gravis. *Brain*. 2008;131(7):1940–1952.
25. Chang T, Leite MI, Senanayake S, Gunaratne PS, Gamage R, Riffsy MTM, et al. Clinical and serological study of myasthenia gravis using both radioimmunoprecipitation and cell-based assays in a South Asian population. *J Neurol Sci*. 2014;343(1–2):82–7.

26. Tsonis AI, Zisimopoulou P, Lazaridis K, Tzartos J, Matsigkou E, Zouvelou V, et al. MuSK autoantibodies in myasthenia gravis detected by cell based assay — A multinational study. *J Neuroimmunol.* 2015;284:10–7.
27. Devic P, Petiot P, Simonet T, Stojkovic T, Delmont E, Franques J, et al. Antibodies to clustered acetylcholine receptor: expanding the phenotype. *Eur J Neurol.* 2014;21(1):130–4.
28. Rodriguez Cruz PM, Huda S, López-Ruiz P, Vincent A. Use of cell-based assays in myasthenia gravis and other antibody-mediated diseases. *Exp Neurol.* 2015;270:66–71.
29. Evoli A, Bianchi MR, Riso R, Minicuci GM, Batocchi AP, Servidei S, et al. Response to Therapy in Myasthenia Gravis with Anti-MuSK Antibodies. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132(1):76–83.
30. Evoli A, Tonali PA, Padua L, Monaco ML, Scuderi F, Batocchi AP, et al. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain.* 2003;126(10):2304–2311.