



## Tesis Doctoral

# **BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA MIASTENIA**

**Autora:**

**Eugenia Martínez Hernández**

**Directora:**

**Isabel Illa Sendra**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

2013



**A Charly, Eva y Sara,  
porque lo son todo**

**A mis padres  
y mi hermano**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Isabel, por introducirme en el mundo de la investigación, por transmitirme su interés por la miastenia y por permitirme trabajar estos años con un equipo de grandes profesionales.

A Edu y Noemí, por enseñarme a construir con buenos cimientos. A Jordi y Ricard, maestros de la neurología de verdad. A Luis y Gisela, por ser mis hermanos gemelos en la Neuroinmunología. A Bàrbara, Xavi y Miquel, por el codo con codo, los cafés, las sonrisas. A Fina, la de las manos de oro, nuestra mamá en el labo. A Esther y sus libretas mágicas, de muestras y protocolos. A Aída y Sonia, por su estilo y gran compañerismo. A Cristina, Elena, Marina, Mireia y Alba, porque fue breve pero aprendimos juntas.

A Josep y a Myrna, por todo lo que me han enseñado y por darme la oportunidad de seguir disfrutando de un trabajo apasionante. A Maartje por transmitir ilusión y ganas continuamente. A Rita y su lab, por su gran amabilidad e interés. A Lindsey, Sophia y Karen por hacer que la experiencia americana fuese genial.

A nuestra “familia” de Philadelphia, Laura, Albert y Adela, María y Kippy, no habría sido perfecto sin vosotros. A Maarten, por hacernos sentir más europeos en América y más americanos en Europa, por sus consejos. A Anna, por ser una excelente compañera.

Y tras mi reciente paso a través de la barrera hematoencefálica, a Cesc y Albert, por su gran calidad. A Lidia, Mar, Thaís, Maria, Núria, Helena, Esther, Merche y Eva, chicas, lo nuestro promete. A los chicos, Jesús y Francesco, en minoría pero haciendo piña. A Romana y Frank, porque los queríamos retener aquí. A Sara, Núria, Montse, Yolanda y María, por su cálida acogida.

A Álex, Anka, Isabel, Dani, Marta, María, Marc, Mercè, Sergi, Joan, porque además de formarnos juntos lo pasamos en grande.

A Susana, Manolo, Ale, David y Raquel, por los empujones oportunos.

A las murcianicas, los de la Facultad, los de París, todo tiene un porqué.

A mi abuela Eugenia, a Mercedes, a Luisa y a Juan, que se fueron pero siempre están presentes.

A Carlos, Silvia, Anna, Pepón, Esther, Albert y las peques, por su apoyo constante y el calor con aroma de magret y foie.

A mi hermano y mis padres, por indicarme el mejor camino y la suerte que tengo de que estén siempre ahí.

A Charly, por la complicidad, su constancia, por ser ejemplo y por hacerme sentir tan afortunada. A Eva y a Sara, porque ellas lo han vivido desde dentro y porque son lo mejor que me ha pasado.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1. DEFINICIÓN DE MIASTENIA.....	3
<u>Epidemiología</u> .....	4
<u>Clínica</u> .....	5
<u>Inmunogenética</u> .....	9
<u>Diagnóstico</u> .....	10
1. Test de edrofonio	
2. Estudios electrofisiológicos	
3. Determinación de anticuerpos	
4. Estudios radiológicos	
<u>Diagnóstico diferencial</u> .....	15
<u>Tratamiento</u> .....	15
1. Sintomático	
2. Timectomía	
3. Inmunomoduladores	
4. Inmunosupresores	
a. <i>Corticoides</i>	
b. <i>Azatioprina</i>	
c. <i>Micofenolato de mofetilo</i>	
d. <i>Ciclosporina</i>	
e. <i>Tacrolimus</i>	
f. <i>Ciclofosfamida</i>	
g. <i>Rituximab</i>	
<u>Escalas de evaluación clínica</u> .....	25
<b>I. INMUNOPATOGÉNESIS</b> .....	27

<u>Unión Neuromuscular</u> .....	27
<u>Miastenia con anticuerpos anti-RACH</u> .....	30
<u>Miastenia con anticuerpos anti-MuSK</u> .....	36
<u>Anticuerpos en miastenia con timoma o de inicio tardío</u> .....	38
<u>Miastenia seronegativa</u> .....	40
1. Anticuerpos de baja afinidad	
2. Anticuerpos anti-LRP4	
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	<b>47</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>I. Respuesta al tratamiento inmunosupresor con Rituximab en pacientes con miastenia refractaria</b> .....	<b>51</b>
1. Pacientes	
2. Tratamiento	
3. Evaluación clínica	
4. Determinación de anticuerpos	
5. Estudio de subpoblaciones linfocitarias e inmunoglobulinas	
6. Análisis estadístico	
7. Aprobaciones	
<b>II. Búsqueda de nuevos autoanticuerpos en miastenia seronegativa</b> .....	<b>54</b>
1. Pacientes	
2. Estudios inmunohistoquímicos	
3. Inmunofluorescencia sobre cultivo de miotubos	
4. Inmunofluorescencia sobre cultivo de neuronas	
5. Inmunoprecipitación	
6. Array de proteínas humanas	
7. Ensayo celular	
8. Inmunoblot	



9. ELISA

<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
I. Respuesta al tratamiento inmunosupresor con Rituximab en pacientes con miastenia refractaria.....	67
II. Búsqueda de nuevos autoanticuerpos en miastenia seronegativa.....	72
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	<b>89</b>
I. Respuesta al tratamiento inmunosupresor con Rituximab en pacientes con miastenia refractaria.....	89
II. Búsqueda de nuevos autoanticuerpos en miastenia seronegativa.....	92
1. Anticuerpos contra Cortactin	
2. Anticuerpos contra DPPY	
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>101</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>103</b>



## ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ATT</b>	Toxina anti-tetánica
<b>BTX</b>	Bungarotoxina
<b>CIDP</b>	Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica
<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>PPM</b>	Potencial de placa motora
<b>HEK</b>	Human embryonic kidney
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>IgIV</b>	Inmunoglobulinas intravenosas
<b>Kv</b>	Canal de potasio voltaje-dependiente
<b>LEMS</b>	Lambert-Eaton myasthenic syndrome
<b>LRP4</b>	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4
<b>MGFA</b>	Myasthenia Gravis Foundation of America
<b>MuSK</b>	Receptor de tirosin-kinasa específico de músculo
<b>NMO</b>	Neuromielitis óptica
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PFA</b>	Parafolmaldehído
<b>RACH</b>	Receptor de acetilcolina
<b>SGB</b>	Síndrome de Guillain-Barré
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>UNM</b>	Unión neuromuscular
<b>VGCC</b>	Canal de calcio voltaje-dependiente



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. DEFINICIÓN DE MIASTENIA

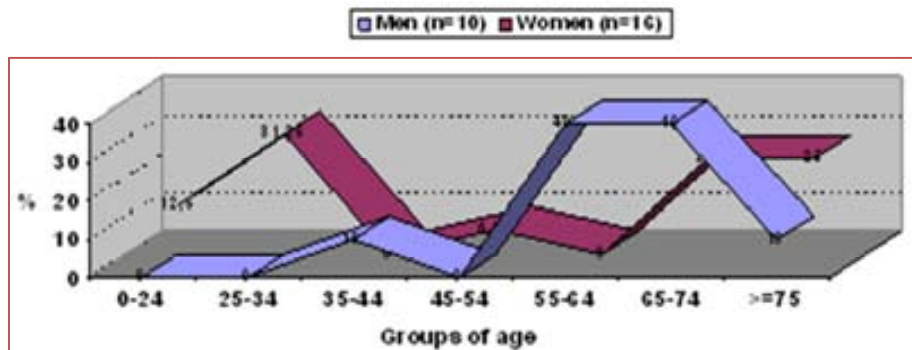
La miastenia es una enfermedad autoinmune de la unión neuromuscular (UNM) que representa el prototipo de patología mediada por anticuerpos<sup>(1)</sup>. En la mayoría de los casos está causada por autoanticuerpos patogénicos dirigidos contra el receptor de acetilcolina (RACH) del músculo esquelético<sup>(2)</sup>. El receptor de tirosin-kinasa específico de músculo (MuSK), otro componente de la terminación post-sináptica muscular, también es diana inmunológica<sup>(3)</sup>. El origen de la respuesta autoinmune en la miastenia no se conoce, pero las alteraciones del timo (hiperplasia o neoplasia)<sup>(4,5)</sup> y la predisposición genética<sup>(6)</sup> parecen jugar un papel importante. La manifestación clínica más característica es la debilidad muscular fluctuante que empeora con el esfuerzo.

Según su presentación clínica y las características asociadas, la miastenia se puede clasificar en diferentes subtipos basados en la distribución de la debilidad muscular (ocular o generalizada), la edad de inicio, las alteraciones tímicas y el perfil de autoanticuerpos<sup>(7)</sup>. El reconocimiento de estos subtipos clínicos ayuda a determinar el manejo y el pronóstico de los pacientes. El uso de inmunosupresores para el tratamiento de la miastenia ha reducido de forma notable la mortalidad y mejorado la calidad de vida de los pacientes<sup>(8)</sup>.

## Epidemiología

La miastenia es una enfermedad bastante infrecuente, aunque su prevalencia ha aumentado con el tiempo, hasta 150 por millón de habitantes. Este aumento se debe probablemente a la mejoría en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad y al aumento en la esperanza de vida de la población general. La incidencia varía ampliamente, entre 1.7 y 21 por millón de habitantes y año, según la procedencia geográfica de los estudios<sup>(9)</sup>. En un estudio prospectivo efectuado en la provincia de Barcelona se demostró una de las incidencias más altas reportadas, de 21 casos por millón<sup>(10)</sup>. El sexo y la edad influyen en la aparición de la miastenia; las mujeres se ven afectadas casi tres veces más que los hombres por debajo de los 40 años, mientras que a partir de los 50 años la incidencia es mayor en hombres<sup>(11)</sup> (**Figura 1**). En la infancia la miastenia es infrecuente en Europa y Norteamérica, constituyendo el 10-15% de los casos, mientras que en países asiáticos como China hasta un 50% de los pacientes presentan síntomas antes de los 15 años, principalmente formas oculares<sup>(12)</sup>.

**Figura 1. Incidencia de miastenia en una comarca de Barcelona durante 10 años de seguimiento.**



*Adaptado de Aragonés y cols. Neurology 2003*

## Clínica

El sello clínico de la miastenia es la debilidad fatigable que afecta a ciertos grupos musculares susceptibles. Los pacientes notan normalmente que la debilidad fluctúa de un día a otro o incluso de una hora a otra, empeora con la actividad y mejora con el descanso. Pueden presentar un grado variable de ptosis, diplopía, disartria, disfagia, disnea, debilidad facial o debilidad fatigable de las extremidades o axial. La presentación inicial más frecuente es la debilidad ocular, en forma de ptosis y/o diplopía fluctuante (**Figura 2**) que aparece en un 85% de los pacientes<sup>(11)</sup>.

**Figura 2.**



En los primeros dos años desde el inicio la enfermedad suele progresar hacia la debilidad muscular generalizada. La debilidad facial es frecuente, muchos pacientes con miastenia presentan debilidad para la oclusión forzada de los párpados (**Figura 3**) (no esconden las pestañas), con o sin afectación facial inferior (**Figura 4**).

**Figura 3.**



**Figura 4.**



La debilidad bulbar puede ser el síntoma inicial hasta en el 15% de los pacientes, presentándose como disfagia indolora, disartria o debilidad masticatoria. En algunos casos, debido a la ausencia de síntomas oculares, estos pacientes pueden ser diagnosticados de forma errónea como enfermedad de neurona motora. La debilidad respiratoria es infrecuente como síntoma inicial pero puede poner en riesgo la vida del paciente, requiriendo una intervención terapéutica urgente. Se puede observar de forma rara debilidad muscular de cinturas predominante o incluso formas distales **(Figura 5)**<sup>(13,14)</sup>. La miastenia tiene un curso muy variado, muchos pacientes pueden presentar durante el primer año empeoramiento de los síntomas desencadenado por infecciones, estrés emocional, cirugía o fármacos. La remisión espontánea a largo plazo es infrecuente pero se ha descrito en un 10-20% de pacientes<sup>(11)</sup>.

**Figura 5.**



Los pacientes con miastenia generalizada pueden dividirse en formas de inicio temprano (antes de los 40 años) y formas de inicio tardío<sup>(15)</sup>. Con inicio temprano suelen ser mujeres con anticuerpos anti-RACH e hiperplasia tímica. También pueden tener otras enfermedades autoinmunes, principalmente tiroiditis<sup>(16)</sup>. Con inicio tardío son más a menudo hombres y tienen el timo normal o atrófico. Pero existen pocos



estudios histológicos en este grupo de edad porque no se suele hacer timectomía a los pacientes mayores de 50 años a no ser que tengan un timoma. El fenotipo puede ser ocular o generalizado pero el curso de la enfermedad es típicamente más grave que en los de inicio temprano y las remisiones espontáneas son muy raras<sup>(17)</sup>. Estos pacientes tienen anticuerpos contra proteínas del músculo estriado (titina, receptor de rianodina) además de los anti-RACH<sup>(18)</sup>.

Entre un 10 y un 15% de pacientes con miastenia tienen timoma, un tumor epitelial del timo. En estos casos la miastenia es igual de frecuente en hombres y mujeres y puede presentarse a cualquier edad, con un pico de inicio a los 50 años<sup>(19)</sup>. La clínica tiende a ser más grave, con generalización rápida y debilidad bulbar, pero el pronóstico a largo plazo es similar al de los pacientes con miastenia de inicio tardío. Suelen tener títulos altos de anticuerpos anti-RACH y también anti-músculo estriado. La cirugía normalmente consigue extirpar el tumor de forma completa y permanente, pero los síntomas de miastenia persisten y hacen que se requiera tratamiento inmunosupresor crónico en estos pacientes.

Aproximadamente un 15% de pacientes con miastenia generalizada no tienen anticuerpos anti-RACH. En un 20-40% de pacientes de este grupo se pueden detectar anticuerpos anti-MuSK, otra proteína post-sináptica de la UNM. Habitualmente estos pacientes tienen un fenotipo clínico diferenciado, con debilidad muscular

predominantemente cervical, respiratoria (**Figura 6**) y bulbar<sup>(20)</sup>. No es raro observar atrofia de la musculatura lingual (**Figura 7**).

**Figura 6.**



**Figura 7.**



En los pacientes con miastenia MuSK+ se ha descrito una respuesta irregular a anticolinesterásicos, incluso empeoramiento en algunos casos<sup>(21)</sup>. Las pacientes son más mujeres, el inicio de la miastenia suele ser más temprano, con un pico de incidencia en la cuarta década (la miastenia RCh+ en la tercera década), y raramente se ha descrito por encima de los 60 años. A diferencia de los pacientes con miastenia RCh+ los pacientes MuSK+ tienen con menos frecuencia debilidad ocular pura al inicio, habiendo un 5% que nunca la presentan, pero sin embargo la afectación de la musculatura bulbar al inicio es más frecuente que en la miastenia RCh+<sup>(22)</sup>. Otra de las principales diferencias es que el timo no está alterado en la miastenia MuSK+<sup>(23)</sup>.

Los pacientes con miastenia que no tienen anticuerpos anti-RCh o anti-MuSK se denominan seronegativos. Es un grupo heterogéneo clínicamente, pudiendo presentar síntomas puramente oculares, generalizados leves o graves.

La miastenia ocular es aquella que permanece limitada, con debilidad de la musculatura extraocular únicamente. Supone un 17% de la población blanca con miastenia, siendo más frecuente en asiáticos (hasta un 58%), fundamentalmente niños. Hasta un 50% de pacientes tienen anti-RACH. Si no se generaliza en los 2 primeros años, existe un 90% de probabilidad de que la enfermedad permanezca localizada<sup>(24)</sup>.

### Inmunogenética

La heterogeneidad clínica y biológica de la miastenia autoinmune parece correlacionarse con marcadores genéticos, particularmente los genes HLA<sup>(15)</sup>. El hallazgo más consistente es la asociación de los alelos HLA-DR3 y B8 con la miastenia de inicio temprano e hiperplasia tímica. La miastenia de inicio tardío se asocia, pero en menor medida con HLA-DR2 y B7<sup>(6,25)</sup> y en población noruega con el HLA-DRB1\*15:01<sup>(26)</sup>. En pacientes asiáticos se han reportado asociaciones de miastenia y HLA diferentes, existiendo una alta frecuencia de HLA-DR9 en pacientes chinos y japoneses y asociación entre miastenia ocular y HLA-BW46 en chinos<sup>(25,27)</sup>. No se han encontrado asociaciones genéticas claras en la miastenia con timoma, pero los pacientes con timoma y cierto perfil genético se sabe que tienen un mayor riesgo de desarrollar miastenia<sup>(28)</sup>. Recientemente se ha descrito una asociación con DR14-DQ5 en pacientes con anti-MuSK<sup>(29)</sup>.

Fuera del complejo mayor de histocompatibilidad se han descrito variaciones asociadas con la miastenia RCh+ en los genes de la proteína tirosin-fosfatasa (PTPN22)<sup>(30)</sup>, el receptor Fc gamma (FCGR2)<sup>(31)</sup> y el receptor colinérgico nicotínico alpha (CHRNA1)<sup>(32)</sup>; genes que intervienen en la respuesta inmune. Recientemente también se ha descrito la asociación del gen TNIP1 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 *TNFAIP3* interacting protein 1) con la miastenia de inicio temprano<sup>(33)</sup>. Este gen, que inhibe la vía del factor nuclear NF-κB y cuya alteración en ratones aumenta los niveles de inmunoglobulinas, se ha reportado como alelo de riesgo también en pacientes con otras enfermedades autoinmunes como el lupus o la psoriasis.

## Diagnóstico

La confirmación del diagnóstico clínico de miastenia se puede realizar mediante pruebas a pie de cama del paciente, electrofisiológicas o inmunológicas.

1. **Test de edrofonio:** consiste en la administración intravenosa de cloruro de edrofonio, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, y la observación de si en el paciente se produce una mejoría de la fuerza muscular; por ejemplo, la desaparición de una ptosis palpebral o la recuperación de un músculo extraocular parético (**Figura 8**).

**Figura 8.**

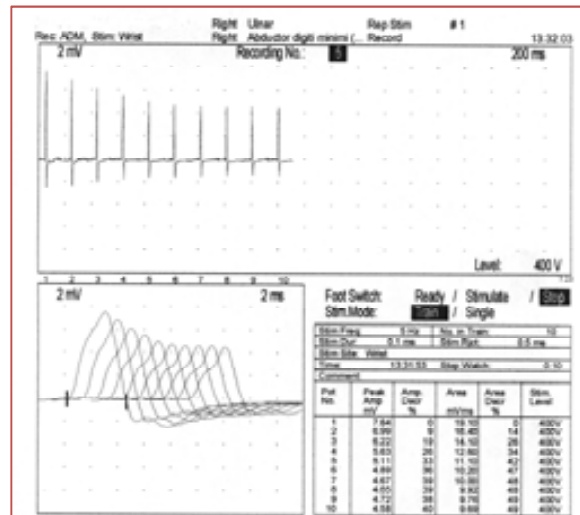


El edrofonio prolonga la duración de la acción de la acetilcolina en la UNM, aumentando la amplitud y duración del potencial de placa motora. Según datos publicados la sensibilidad en el diagnóstico de este test es del 71.5-95% en miastenia generalizada RCh+. Aunque las complicaciones graves con bradicardia y síncope son raras se recomienda la monitorización cardíaca durante el procedimiento<sup>(34)</sup>. El test del hielo es una prueba no farmacológica que consiste en colocar hielo encima del ojo durante 2-5 minutos y observar si mejora la ptosis. Su uso estaría indicado principalmente en el caso de pacientes con ptosis en los que se contraindica el test de edrofonio<sup>(35)</sup>.

2. **Estudios electrofisiológicos:** el más utilizado es la estimulación repetitiva. En los trastornos de la UNM la estimulación nerviosa a bajas frecuencias (2-5 Hz) produce una reducción progresiva en la amplitud del potencial de acción muscular compuesto, lo que se conoce como decremento (**Figura 9**). En aproximadamente el 75% de pacientes con miastenia generalizada la estimulación repetitiva resulta anormal, con mayor probabilidad en músculos

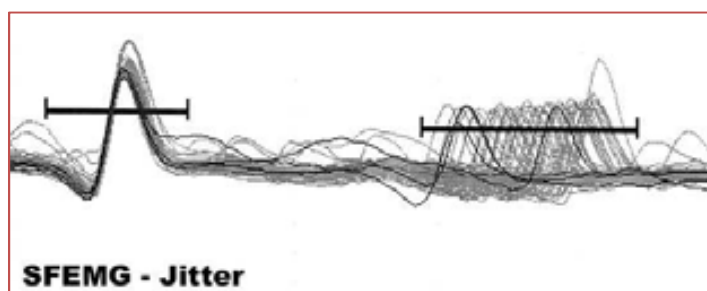
proximales o faciales. En el caso de pacientes con miastenia ocular el porcentaje desciende a menos del 50%.

**Figura 9.**



En la electromiografía de fibra aislada se utiliza un electrodo de aguja concéntrica especialmente diseñado, que permite identificar potenciales de acción de fibras musculares individuales que pertenecen a la misma unidad motora. El jitter neuromuscular es el resultado de las fluctuaciones entre dos de estos potenciales (**Figura 10**). Entre el 95-99% de pacientes con miastenia tienen jitter anormal, si se exploran los músculos adecuados<sup>(36)</sup>. Pero aunque sea muy sensible, el jitter aumentado no es específico de trastornos de la UNM, pudiendo encontrarse en otras enfermedades de nervio o músculo.

**Figura 10.**



3. **Determinación de anticuerpos:** es la prueba inmunológica fundamental para el diagnóstico de miastenia. Los anticuerpos anti-RACH se detectan en suero mediante radioinmunoensayo, que mide la cantidad de anticuerpos que precipitan el RACH muscular detectado mediante su unión con el antagonista colinérgico  $\alpha$ -bungarotoxina (BTX) radiomarcado<sup>(37)</sup>. Los anticuerpos IgG del paciente inmunoprecipitan RACH de músculo humano solubilizado con detergente y marcado con BTX I<sup>125</sup>, una toxina de serpiente que se une al receptor con gran afinidad fuera del dominio de unión del ligando. La sensibilidad es de un 85% aproximadamente en miastenia generalizada y 50% ocular<sup>(38)</sup> y tiene la ventaja de que puede estimar de forma precisa el título de anticuerpos. Aunque esto no se correlaciona con la gravedad de los síntomas entre pacientes diferentes, puede ser un indicador del curso de la enfermedad en un mismo paciente<sup>(39)</sup>.

Existen otras pruebas que miden mediante ELISA la capacidad del suero del paciente de inhibir la unión de ligandos colinérgicos (anticuerpos monoclonales bloqueantes del RACH) o de inducir la modulación de los RACH

en cultivo celular (anticuerpos moduladores del RACH), pero añaden poca sensibilidad al diagnóstico<sup>(40)</sup>.

Los anticuerpos anti-MuSK también se miden mediante radioinmunoensayo, utilizando el dominio extracelular completo de MuSK humano marcado directamente con I<sup>125</sup>. Se suelen determinar en pacientes con miastenia generalizada negativos para anti-RACH, resultando positivos en aproximadamente un 40% de estos casos<sup>(41)</sup>.

Los anticuerpos anti-músculo estriado, que reconocen proteínas citoplasmáticas musculares (titina, miosina, actina y receptor de rianodina) se detectan en el 75-85% de pacientes con miastenia y timoma, y también en algunos con timoma sin miastenia<sup>(18)</sup>. Su presencia en pacientes con miastenia de inicio temprano hace sospechar la presencia de timoma. Anti-titina y otros se pueden encontrar hasta en el 50% de pacientes con miastenia de inicio tardío, sin timoma<sup>(42)</sup>.

4. **Estudios radiológicos:** en todos los pacientes en los que se confirma el diagnóstico de miastenia se realiza una tomografía axial computerizada o resonancia magnética de tórax para descartar la presencia de timoma.



## Diagnóstico diferencial

**Tabla 1. Diagnósticos diferenciales de la miastenia**

<b>Síndrome de Lambert-Eaton</b>	Preservación relativa de músculos extraoculares; hiporreflexia, disautonomía (boca seca, impotencia, hipotensión postural)
<b>Miastenia congénita</b>	Seronegativa; inicio en la infancia, no responde a inmunomoduladores
<b>Botulismo</b>	Progresión rápida y descendente de la debilidad; afectación pupilar y autonómica. Datos epidemiológicos
<b>Enfermedad de neurona motora</b>	Presencia de signos de primera motoneurona; calambres/fasciculaciones, atrofia
<b>Enfermedades mitocondriales</b>	Inicio gradual, sin fluctuaciones, debilidad simétrica, oftalmoparesia sin diplopía
<b>Polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda</b>	Sin fluctuaciones; arreflexia, inicio agudo. Síntomas y/o signos sensitivos
<b>Oftalmopatía tiroidea</b>	Proptosis

## Tratamiento

El tratamiento de la miastenia se puede dividir en 4 categorías:

1. Tratamiento sintomático
2. Timectomía
3. Tratamiento inmunomodulador
4. Tratamiento inmunosupresor

### **1. Anti-colinesterásicos**

Los inhibidores de la colinesterasa orales son el tratamiento más inmediato, sintomático, en los pacientes con miastenia<sup>(1)</sup>. Aumentan la cantidad de acetilcolina disponible para su unión al receptor en la UNM. La piridostigmina es el más utilizado,

la dosis inicial en el adulto es 15-30 mg cada 4-6 horas, que se puede aumentar y ajustar hasta alcanzar el máximo beneficio con los mínimos efectos secundarios (diarrea, dolor abdominal).

Los anti-colinesterásicos no suelen controlar por completo los síntomas ni afectan a la progresión de la enfermedad, pero en casos de miastenia ocular leve pueden ser suficientes (**Figura 11**). Dosis altas (más de 450 mg al día, o inferiores en pacientes con insuficiencia renal) pueden provocar empeoramiento de la fuerza muscular debido a un bloqueo en la despolarización de la transmisión neuromuscular, y se suelen acompañar de síntomas muscarínicos tipo hipersalivación, bradicardia, hiperhidrosis, lagrimeo y miosis.

**Figura 11.**



## 2. Timectomía

La realización de timectomía en la miastenia se basó inicialmente en observaciones empíricas en las que los pacientes con miastenia y timoma mejoraban tras la extirpación del timo. Debido a que el timo podría jugar un papel patogénico en la enfermedad, durante más de 70 años se ha empleado la timectomía como tratamiento

en la miastenia sin timoma. Hasta ahora no se han realizado ensayos aleatorizados y controlados y las conclusiones de los estudios retrospectivos pueden resultar confusas debido a las diferencias entre los grupos expuestos o no a la cirugía. Un meta-análisis exhaustivo concluyó que podría hallarse beneficio en la timectomía y debería recomendarse como tratamiento en pacientes seleccionados<sup>(43)</sup>. La mayoría de expertos considera como opción terapéutica la timectomía en pacientes con anti-RACH, miastenia generalizada e inicio antes de los 50 años. Recientemente ha concluido un ensayo internacional, prospectivo (liderado por el National Institutes of Health, Estados Unidos, y en el que intervienen 30 países) enmascarado y aleatorizado sobre timectomía en miastenia sin timoma, cuyos resultados ayudarán a clarificar este tema.

### **3. Inmunomoduladores**

La inmunoglobulinas intravenosas (IgIV) y el recambio plasmático se utilizan como tratamientos a corto plazo, en exacerbaciones de la miastenia o cuando es necesario obtener una respuesta rápida. El recambio plasmático reduce temporalmente la concentración de anticuerpos circulantes y produce una mejoría en cuestión de días en la mayoría de pacientes. Habitualmente se realiza un recambio a días alternos hasta un total de 4-6 veces. Los efectos secundarios más comunes son la hipotensión y las parestesias debidas a la hipocalcemia inducida por citrato; además se pueden reducir los factores de coagulación, sobre todo con tratamientos repetidos, y predisponer al sangrado<sup>(44)</sup>.

Las IgIV se utilizan a menudo en pacientes con exacerbaciones. Ensayos aleatorizados y controlados han demostrado una eficacia similar al recambio plasmático, que es igual a dos dosis (1g/kg vs 2 g/kg)<sup>(45)</sup>. El mecanismo por el cual las IgIV producen la mejoría no se conoce completamente pero las dos funciones principales podrían ser la competición con los autoanticuerpos y la unión al receptor Fc<sup>(46)</sup>. Por otro lado, la infusión de IgIV supone administrar volúmenes grandes, con preparaciones viscosas y puede provocar complicaciones raras pero graves, además de ser un tratamiento caro<sup>(47)</sup>.

#### 4. Inmunosupresores

La mayoría de recomendaciones sobre el uso de inmunosupresores en la miastenia se fundamentan en evidencias de ensayos aleatorizados y controlados pero pequeños, o en la experiencia basada en observaciones. El diseño de ensayos clínicos tiene la gran limitación de que la miastenia es una enfermedad rara.

- a. *Corticoides*: fueron los primeros inmunosupresores utilizados en miastenia y siguen siendo los más usados. En cuatro series retrospectivas amplias sobre tratamiento corticoideo para la miastenia generalizada, más del 73% de 422 pacientes tratados alcanzaron una mejoría importante o remisión<sup>(48-51)</sup>. Generalmente se utiliza prednisona cuando los síntomas no se controlan adecuadamente con anti-colinesterásicos sólo. Se pueden alcanzar dosis altas al inicio (0.75-1 mg/kg/día) y una vez conseguida la mejoría máxima, reducirla de

forma progresiva o mantenerla a dosis bajas durante años. Aproximadamente un tercio de los pacientes pueden experimentar un empeoramiento transitorio al iniciar la prednisona a dosis altas, que empieza en los primeros 7-10 días y puede durar varios más. En pacientes con afectación bulbar o respiratoria se pueden dar IgIV o recambio plasmático antes de iniciar la prednisona para prevenir o reducir esta posible exacerbación y para inducir una respuesta más rápida.

En cuanto a las formas oculares la prednisona debería considerarse en los pacientes que no alcanzan una recuperación completa de los síntomas con anti-colinesterásicos<sup>(52)</sup>. Aunque los corticoides son muy efectivos en la miastenia su uso crónico puede asociarse a múltiples efectos adversos (retención de sodio y líquidos, obesidad, pérdida de potasio, hipertensión, intolerancia a la glucosa, osteoporosis, psicosis o ansiedad, cataratas o glaucoma, úlcera péptica)<sup>(53)</sup>.

- b. *Azatioprina*: es un antimetabolito de las purinas que interfiere con la proliferación de células T y B. Estudios retrospectivos han indicado que puede ser efectivo en el 70-90% de pacientes con miastenia pero el inicio de su efecto beneficioso puede tardar hasta 12 meses<sup>(54,55)</sup>. La azatioprina se puede usar en monoterapia o en combinación con

prednisona, como agente ahorrador de dosis, lo que permite una mejor tolerancia y efectividad comparada con prednisona sola<sup>(56)</sup>. Habitualmente se inicia a una dosis de 50 mg al día y, en ausencia de efectos adversos sistémicos, se aumentan 50 mg semanales hasta los 2-3 mg/kg/día. En el 15-20% de los pacientes se puede producir una reacción idiosincrática con síntomas pseudogripales a los 10-14 días del inicio del tratamiento. La hepatotoxicidad y la leucopenia son efectos adversos importantes pero reversibles si se detectan precozmente y se reduce la dosis de azatioprina o se retira.

Los pacientes con déficit del enzima tiopurin-metil-transferasa no pueden metabolizar completamente la azatioprina, por lo que dosis normales pueden producir una leucopenia grave<sup>(57)</sup>. Se recomienda la determinación de la concentración de este enzima antes del inicio del tratamiento con azatioprina y, sobre todo, si se observa una leucopenia precoz o marcada en el seguimiento analítico. Su uso a largo plazo puede aumentar el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer. Este riesgo es dependiente de la dosis y de la duración del tratamiento, por lo que se recomienda mantener la dosis de azatioprina mínimamente efectiva.

- c. *Micofenolato de mofetilo*: bloquea selectivamente la síntesis de las purinas, suprimiendo por tanto la proliferación de células T y B. La eficacia clínica del micofenolato se ha sugerido en series de casos y en un análisis retrospectivo de 85 pacientes con miastenia<sup>(58,59)</sup>. La dosis estándar utilizada son 1000 mg dos veces al día, aunque se puede aumentar hasta 3000 mg al día. Dosis más altas se han asociado a mielosupresión, por lo que se recomienda un control estricto del hemograma de forma mensual. Dos estudios recientes, controlados, no han demostrado beneficio adicional de micofenolato frente a 20 mg de prednisona diaria como terapia inicial<sup>(60)</sup>, ni un efecto significativo como agente ahorrador de dosis en pacientes tratados con prednisona<sup>(61)</sup>. Como posible explicación de estos resultados negativos se han citado diversos factores, como la poca gravedad de la enfermedad en los pacientes tratados, una respuesta mejor de la esperada a dosis bajas de prednisona y la corta duración de los estudios.
- c. *Ciclosporina*: inhibe la proliferación de células T mediante la disrupción de la señalización de calcineurina, bloqueando la síntesis de interleuquina-2 y y otras proteínas esenciales para la función de las células T CD4. Su eficacia en miastenia procede de un pequeño ensayo clínico aleatorizado, controlado con placebo<sup>(62)</sup> y de estudios retrospectivos que han apoyado su uso como agente ahorrador de corticoides<sup>(63)</sup>. Generalmente se usa ciclosporina en los pacientes en los

que la azatioprina no es efectiva o no se tolera. La dosis inicial recomendada es 4-6 mg/kg repartido en dos dosis, aunque para el mantenimiento suele ser suficiente con 3-4 mg/kg/día. Los efectos secundarios más frecuentes son hirsutismo, hiperplasia gingival, temblor o anemia, pero los limitantes son hipertensión y nefrotoxicidad.

- d. *Tacrolimus (FK506)*: tiene un mecanismo de acción similar a la ciclosporina y su potencial efecto beneficioso se ha sugerido en diversos estudios<sup>(64)</sup>, incluyendo un ensayo aleatorizado pero no enmascarado, en 36 pacientes con miastenia de debut<sup>(65)</sup>. Se ha reportado un beneficio sostenido en pacientes con anticuerpos contra el receptor de rianodina, con la hipótesis de que el efecto es debido a una liberación de calcio sarcoplásmico mediada por el receptor de rianodina<sup>(66)</sup>. En diferentes series se han utilizado dosis diarias de 3-5 mg/día, con un perfil de efectos secundarios que sugiere que es menos nefrotóxico que la ciclosporina.

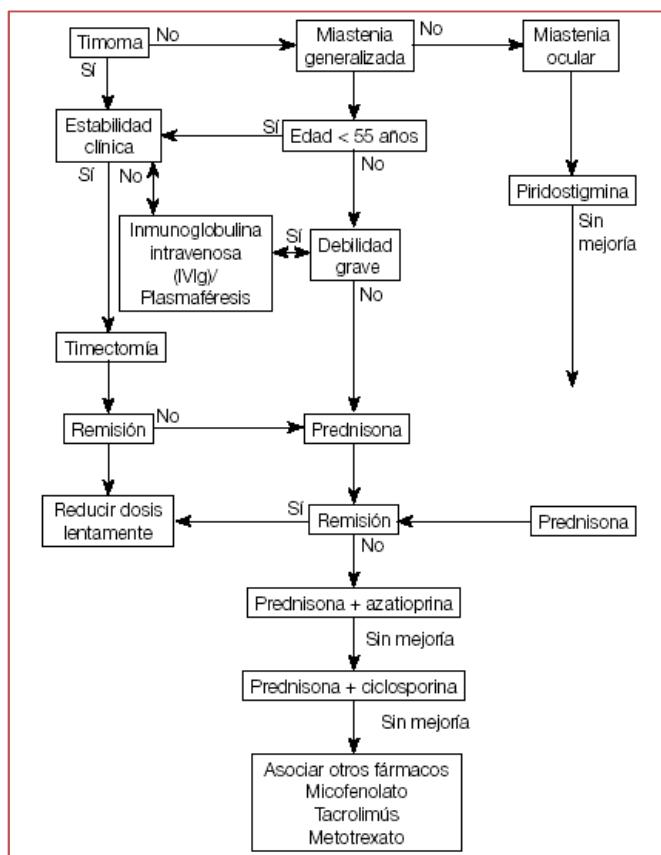
Un pequeño porcentaje de pacientes con miastenia son refractarios al tratamiento o desarrollan efectos adversos intolerables cuando toman prednisona en combinación con uno o dos de los inmunosupresores arriba descritos. Los siguientes fármacos son considerados en estos casos.



e. *Ciclofosfamida*: en un ensayo aleatorizado y controlado, la administración de bolus intravenosos de ciclofosfamida (500 mg/m<sup>2</sup>) en pacientes refractarios a tratamiento consiguió una mejoría de la fuerza muscular y disminuyó el requerimiento de prednisona<sup>(67)</sup>. También se ha observado una respuesta terapéutica remarcable en pacientes refractarios tratados con dosis altas (50 mg/kg) durante 4 días seguido de terapia de rescate, con un beneficio sostenido durante varios años sin presentar recaídas<sup>(68)</sup>. Los efectos secundarios de la ciclofosfamida son frecuentes y potencialmente graves, incluyendo mielosupresión, cistitis hemorrágica y aumento del riesgo de infección y malignidad.

f. *Rituximab*: es un anticuerpo monoclonal quimérico, dirigido contra el marcador de superficie CD20 de las células B<sup>(69)</sup>. Reduce de forma efectiva el recuento de células B circulantes y sobre la base de su potencial para dirigirse contra clones B autorreactivos tiene un papel terapéutico en enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos.

**Figura 12. Esquema terapéutico en pacientes con miastenia**



Nuestro protocolo de tratamiento estándar (**Figura 12**) incluye, además de la timectomía ante la presencia de timoma o en casos seleccionados, prednisona como fármaco de primera línea. Si la respuesta no es adecuada o son necesarias dosis superiores a 40 mg a días alternos pasamos a fármacos inmunosupresores de segunda línea, en primer lugar azatioprina, seguida de ciclosporina y finalmente micofenolato o tacrolimus(70). Se consideran pacientes refractarios al tratamiento aquellos que no presentan una mejoría clínica significativa tras recibir prednisona y haber probado al menos 3 fármacos de segunda línea.

## Escalas de evaluación clínica

En el año 2000 fueron publicadas las recomendaciones para los estándares de la investigación clínica, determinadas por la Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA)(71). Este trabajo, que reunió a un comité de asesores científicos expertos en miastenia, incluye varias clasificaciones: clínica, cuantitativa para medir la gravedad de la enfermedad, para el estado del tratamiento, el estado post-intervención, clasificación de las formas de timectomía y de morbilidad y mortalidad. Están dirigidas a su aplicación en los ensayos terapéuticos en miastenia, con el objetivo de crear parámetros uniformes que permitan la comparación de los análisis de estudios diferentes.

Basándonos en los objetivos de esta tesis, aquí solamente describiremos la clasificación clínica y de estado post-intervención, por haber sido utilizadas en nuestros trabajos publicados.

La clasificación clínica de la MGFA (**tabla 2**) está diseñada para identificar subgrupos de pacientes con miastenia que comparten características clínicas que puedan comportar diferencias en el pronóstico o respuesta al tratamiento. Se recomienda tener en cuenta los músculos más afectados y el momento de máxima gravedad del paciente como punto de referencia.

**Tabla 2. Clasificación clínica de la MGFA**

<b>Clase I</b>		Debilidad <b>ocular</b> . Puede tener debilidad para la oclusión palpebral. Resto de la fuerza muscular normal
<b>Clase II</b>	II a	Predominante en miembros y/o axial
	II b	Predominante en musculatura orofaríngea y/o respiratoria
<b>Clase III</b>	III a	Predominante en miembros y/o axial
	III b	Predominante en musculatura orofaríngea y/o respiratoria
<b>Clase IV</b>	IV a	Predominante en miembros y/o axial
	IV b	Predominante en musculatura orofaríngea y/o respiratoria. Puede incluir sonda nasogástrica
<b>Clase V</b>		Intubación orotraqueal con o sin ventilación mecánica

La clasificación del estado post-intervención (**tabla 3**) está diseñada para determinar el estado clínico de los pacientes con miastenia en cualquier momento después de la instauración de un tratamiento específico. La debilidad para la oclusión palpebral aislada no se considera signo de actividad, pero el uso de anti-colinesterásicos sí porque puede enmascarar síntomas de la enfermedad.

**Tabla 3. Clasificación del estado post-intervención de la MGFA**

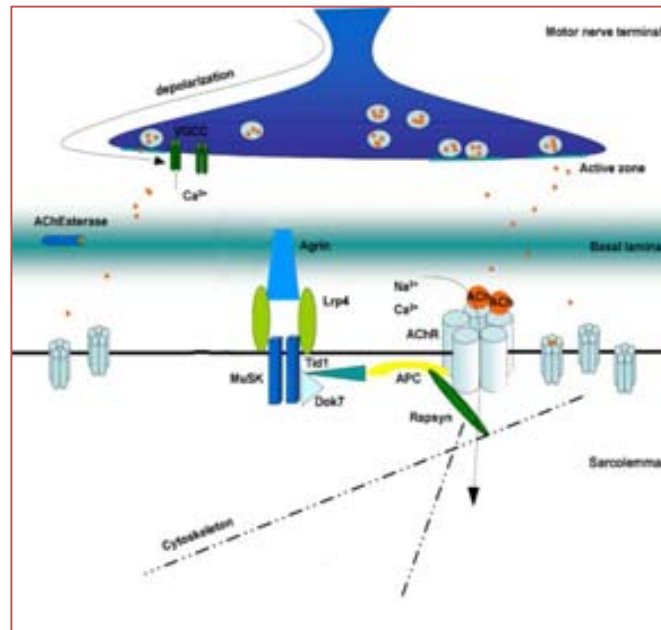
<b>Remisión completa estable (CSR)</b>		Sin síntomas ni signos de miastenia durante al menos un año y sin tratamiento
<b>Remisión farmacológica (PR)</b>		Criterios de CSR pero con algún tipo de tratamiento (excluyendo piridostigmina)
<b>Manifestaciones mínimas (MM)</b>		Sin síntomas ni limitación funcional pero con signos a la exploración minuciosa
	MM-0	Sin tratamiento durante al menos un año
	MM-1	Inmunosupresores pero no piridostigmina
	MM-2	Sólo piridostigmina a dosis bajas (<120 mg/d)
	MM-3	Inmunosupresores y piridostigmina
<b>Mejoría (I)</b>		Disminución sustancial de los síntomas o de la medicación pre-tratamiento
<b>Sin cambio (U)</b>		Sin cambios en los síntomas o en la medicación
<b>Empeoramiento (W)</b>		Aumento sustancial de los síntomas o de la medicación
<b>Exacerbación (E)</b>		Alcanza criterios de CSR, PR o MM pero posteriormente desarrolla más síntomas
<b>Fallecimiento por miastenia (D of MG)</b>		Incluye complicaciones del tratamiento o en los 30 primeros días post-timectomía

## 2. INMUNOPATOGENESIS

### Unión Neuromuscular

La UNM se encarga de la transmisión de señales entre nervio y músculo, traduciendo de forma rápida los potenciales de acción neuronales en contracción muscular (**Figura 13**). Tiene tres componentes básicos: 1) la terminal nerviosa motora pre-sináptica, donde se sintetiza, acumula y libera acetilcolina; 2) el espacio sináptico; y 3) la membrana muscular post-sináptica, que contiene los receptores de acetilcolina y el enzima acetilcolinesterasa.

Figura 13.



*Cortesía de M.G. Huijbers*

Existe una gran densidad de RACH que se encuentran típicamente agregados en las criptas post-sinápticas para asegurar una gran eficiencia en la transmisión de la señal. La agregación de los RACH requiere la unión de la proteína derivada de la motoneurona agrin a LRP4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4) en la membrana post-sináptica. El complejo agrin-LRP4 activa MuSK, lo cual conduce a la agregación de RACH mediante interacción con otras proteínas como rapsin<sup>(72)</sup>.

La transmisión neuromuscular empieza cuando el potencial de acción nervioso entra en la terminal y desencadena la liberación de acetilcolina. La exocitosis de vesículas sinápticas que contienen acetilcolina requiere calcio, el cuál entra a la terminal nerviosa despolarizada por medio de los canales de calcio voltaje dependientes. La

acetilcolina se difunde por el espacio sináptico e interacciona con los receptores en la membrana muscular post-sináptica, causando una despolarización local, el potencial de placa motora (PPM). El PPM en la UNM normal es mucho mayor que el umbral de generación de un potencial de acción de fibra muscular; esta diferencia se ha definido como el factor de seguridad de la transmisión neuromuscular. La acción de la acetilcolina en la membrana post-sináptica finaliza por la acción de la acetilcolinesterasa, que recoge e hidroliza la acetilcolina no unida. En la miastenia, la pérdida de acetilcolina funcional provoca un descenso en la amplitud del PPM que cae por debajo del umbral requerido para la generación del potencial de acción de fibra muscular durante la despolarización nerviosa repetitiva, causando el fallo en la transmisión neuromuscular.

Existen diferentes mecanismos por los que los anticuerpos del suero pueden interferir con la función de las proteínas sinápticas: activación del complemento; modulación antigénica mediante entrecruzamiento (cross-linking) de la proteína diana; competencia por los sitios de unión del ligando o bloqueo estérico, el cual impide cambios conformacionales o la unión a proteínas asociadas<sup>(73)</sup>. La miastenia es heterogénea en su fisiopatología dependiendo del antígeno que se altera y los anticuerpos participantes. Y según el subtipo de miastenia estos mecanismos patogénicos tienen más o menos importancia, dependiendo de factores como especificidad del epítipo, subclase de anticuerpo o densidad de antígeno.

## Miastenia con anticuerpos anti-RACH

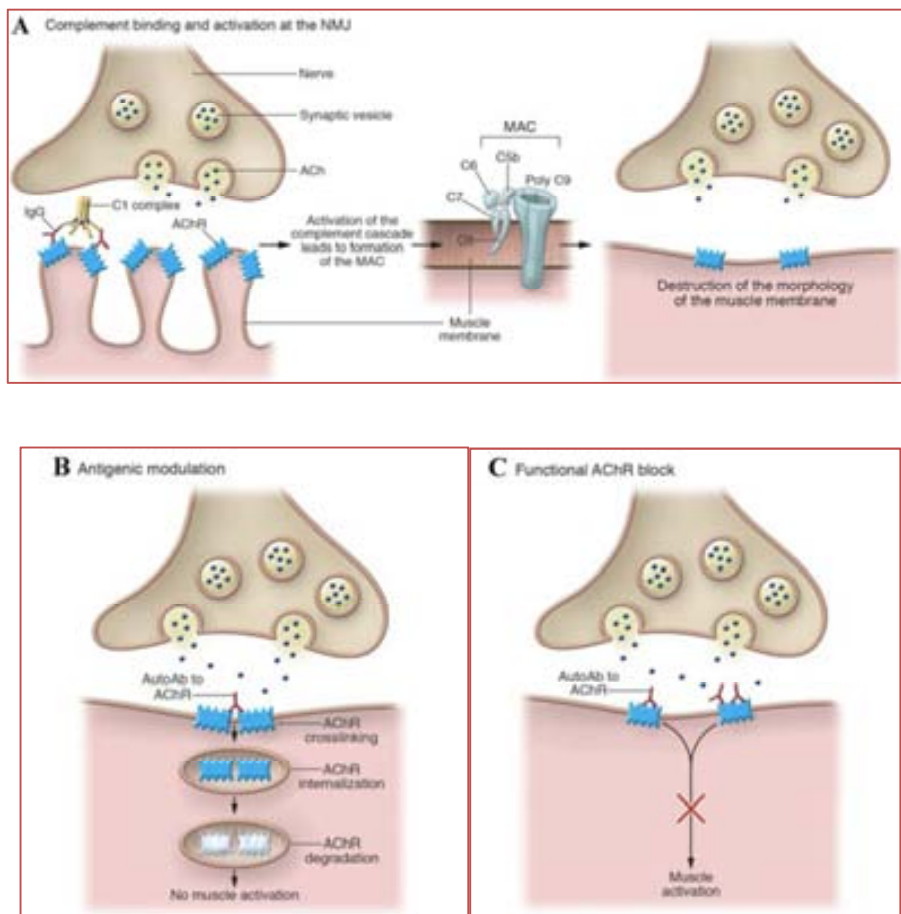
El papel patogénico de estos anticuerpos ha sido claramente demostrado<sup>(2,74,75)</sup> y resulta evidente desde el punto de vista clínico ante la dramática mejoría observada en los pacientes tras retirar los anticuerpos circulantes mediante recambio plasmático<sup>(76)</sup>. Los anticuerpos anti-RACH son de los isotipos IgG1 e IgG3 y por lo tanto capaces de activar complemento. Se unen al dominio extracelular de la molécula pero presentan una reactividad heterogénea contra diferentes regiones del RACH. Aunque los anticuerpos provocan de forma directa la destrucción de la terminal muscular, su alta afinidad y la naturaleza de las IgG altamente mutadas indica que la respuesta humoral es dependiente de células T, existiendo células CD4+ que ayudan a las células B a producir los anticuerpos patogénicos<sup>(77,78)</sup>.

La pérdida de RACH funcionales se rige por tres mecanismos. El más importante es la lisis de la terminal muscular mediada por complemento (**Figura 14 A**), lo que resulta en daño morfológico de la membrana post-sináptica<sup>(79,80)</sup>. Se produce una distorsión y simplificación del patrón normal en pliegues de la membrana post-sináptica, lo cual no sólo tiene un impacto funcional sobre los RACH, sino que también provoca una reducción del número de canales de sodio voltaje dependiente, aumentando así el umbral del potencial de acción de la fibra muscular. En segundo lugar los anticuerpos bivalentes se unen a dos RACH distintos, provocando su internalización acelerada y degradación<sup>(81,82)</sup> (**Figura 14 B**).



Y finalmente, el bloqueo directo de los RACH por los anticuerpos dirigidos contra los sitios de unión de la ACh (interferencia directa con el canal iónico) <sup>(83)</sup> (Figura 14 C).

**Figura 14.**



*Adaptado por R. Robles*

Otra prueba del papel patogénico de los anticuerpos es la miastenia experimental, que se puede inducir en los animales por inmunización con RACH<sup>(2)</sup> o por inyección de anti-RACH<sup>(84)</sup>. Más recientemente se ha observado que también se induce mediante la inyección intraperitoneal de anti-RACH aislados de pacientes con miastenia<sup>(85)</sup>.

Generalmente los títulos de IgG anti-RACH totales combinadas no se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, aunque después del tratamiento inmunosupresor sí se ha encontrado correlación en pacientes individuales<sup>(86,87)</sup>, y también en modelos de miastenia<sup>(88)</sup>. Esta disparidad puede deberse a las diferencias en la actividad funcional de los anticuerpos, como por ejemplo la capacidad para acelerar la tasa de degradación de RACH o de bloquear los sitios de unión de ACh. Además, como las subclases de IgG tienen propiedades inmunológicas diferentes, otra posible explicación para esta pobre correlación es la variación en la distribución de isotipos. La concentración de IgG1 anti-RACH, pero no la de IgG2, 3 y 4, se ha visto que sí correlaciona de forma significativa con la gravedad de la miastenia<sup>(89)</sup>. Y en monos Rhesus la transferencia pasiva de IgG1, pero no de IgG4 anti-RACH causa miastenia<sup>(90)</sup>.

La inmunopatogénesis de la miastenia ocular es similar probablemente a la de la miastenia generalizada. Existe una mayor susceptibilidad de los músculos extraoculares a la enfermedad, que puede derivarse de las diferencias en la morfología y fisiología de la UNM. Dichos músculos presentan hendiduras sinápticas menos prominentes, tienen menos RACH post-sinápticos, unidades motoras más pequeñas y están sujetos a frecuencias de descarga altas. Otro posible factor relevante es la poca expresión de factores reguladores de complemento, que hace que los músculos extraoculares sean más vulnerables al daño mediado por complemento<sup>(91)</sup>.

Por otro lado, durante el ataque de los anticuerpos el músculo presenta una capacidad propia para compensar la pérdida de RACH y sus proteínas asociadas, y esto también condiciona la gravedad de la enfermedad. Existe una variabilidad entre individuos en los mecanismos compensatorios que varían los niveles de expresión de RACH tras el daño producido por los anticuerpos. También se producen cambios a nivel presináptico en la miastenia, como por ejemplo un aumento del enzima que sintetiza la ACh, colina acetiltransferasa y el contenido de ACh<sup>(92)</sup>, así como un aumento en la liberación de ACh por impulso nervioso. Probablemente estos incrementos compensatorios están causados primariamente por la reducción en el número de RACH que propicia mecanismos homeostáticos sinápticos, incluyendo señalización sináptica retrógrada<sup>(93)</sup>.

Aunque el factor desencadenante de la respuesta autoinmune inicial de la miastenia sigue sin conocerse, se ha implicado al timo en este proceso. Más del 80% de pacientes con miastenia de inicio temprano y anti-RACH tienen hiperplasia tímica, que se caracteriza por la presencia de infiltrados linfocitarios y centros germinales similares a los que se encuentran en los nódulos linfáticos. Las glándulas hiperplásicas contienen células T, B y plasmáticas, así como células mioides que expresan el RACH. Tienen todos los componentes necesarios para montar una respuesta inmune contra el RACH, de hecho los timocitos en cultivo generan espontáneamente anticuerpos anti-RACH. Estos hallazgos apoyan la idea de una patogénesis intratímica<sup>(94,95)</sup>. En un primer momento habría una respuesta de células T helper y anticuerpos a las

subunidades individuales del RACH expresadas en el epitelio tímico, seguida de una respuesta a los RACH nativos expresados en las células mioideas<sup>(96)</sup>. Sin embargo, el mecanismo de la autosensibilización en la miastenia de inicio tardío no está claro, pues estos pacientes no presentan alteraciones tímicas. El hecho de que tengan una presentación clínica similar, con los mismos autoanticuerpos, podría hacer pensar que tienen timomas ocultos que son suprimidos por una respuesta autoinmune anti-tumoral.

Los timomas se asocian frecuentemente a enfermedades autoinmunes, debido probablemente a la disregulación en la selección de linfocitos y a que presentan autoantígenos expresados por las células neoplásicas. Las células epiteliales del timoma expresan diversos autoantígenos, incluyendo epítomos de RACH, titina y receptor de rianodina. La presencia simultánea de anticuerpos contra todos estos antígenos podría indicar que las proteínas diana presentan reacciones cruzadas e intervienen en la producción de la enfermedad. Los timomas asociados con miastenia son ricos en células T autorreactivas. Según la teoría actual, estas células autorreactivas serían seleccionadas positivamente para su supervivencia y exportadas a la periferia, donde se activarían para ayudar a las células B productoras de anticuerpos por mecanismos aún desconocidos. En los timomas, la selección negativa y la regulación de las células T autorreactivas está alterada debido a una deficiencia en la expresión del gen regulador autoinmune AIRE y a una pérdida selectiva de células T reguladoras<sup>(97,98)</sup>.

La inmunidad innata actúa como primera línea de defensa contra patógenos, pero también interviene en las enfermedades autoinmunes, desencadenando, manteniendo o modulando el ataque autoinmune. Los toll-like receptors (TLRs) son capaces de detectar patógenos y también moléculas endógenas para después iniciar la respuesta inmune. La expresión de TLR4 está aumentada en células epiteliales del timo inflamado de los pacientes con miastenia, y un estudio reciente ha encontrado que los niveles de TLR9 en las células mononucleares periféricas de pacientes con miastenia se correlacionan con la gravedad de la enfermedad<sup>(99)</sup>.

TLR3 es un receptor sensible a nucleótido que reconoce el ARN de doble cadena y por tanto es importante para la detección de virus. Recientemente se ha demostrado en un modelo animal que la activación de TLR3 por ARN de doble cadena aumenta la expresión de RACH en las células epiteliales tímicas a través de la señalización por interferón  $\beta$ , provocando finalmente anticuerpos anti-RACH, pérdida de RACH en el diafragma y debilidad muscular<sup>(100)</sup>. Además, también se ha encontrado que en el timo de pacientes con miastenia hay niveles más elevados de TLR3, interferón  $\beta$  y otras moléculas de señalización asociadas. Dichos hallazgos sugieren que una infección viral podría desencadenar el aumento de expresión de RACH en el timo mediante interferón  $\beta$ , hecho que podría ser suficiente para desarrollar anticuerpos anti-RACH y síntomas miasténicos.

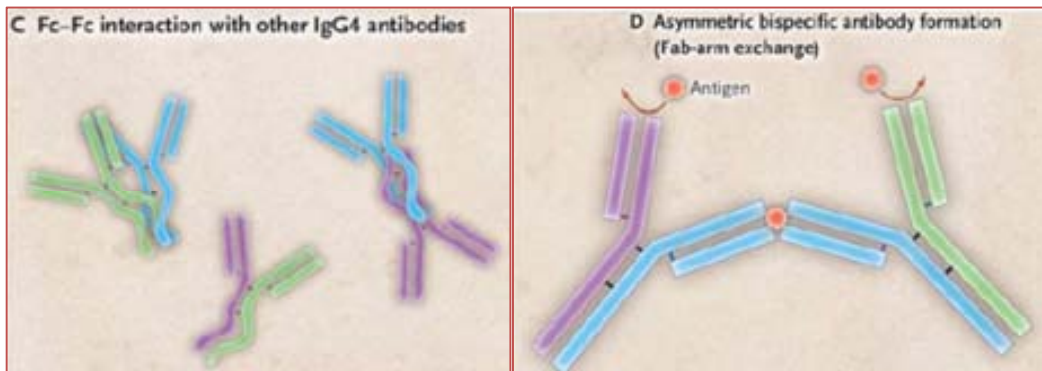
Pero en general el papel de las infecciones virales en la miastenia es un tema controvertido. Un estudio describió la presencia de células B infectadas por virus de Epstein-Barr en el timo de pacientes con miastenia, pero posteriormente no se han podido reproducir estos datos.

### Miastenia con anticuerpos anti-MuSK

Entre un 20 y un 60% de pacientes con miastenia generalizada sin anti-RACH tienen anticuerpos contra MuSK medidos por radioinmunoensayo comercial. Los porcentajes varían según la región geográfica y tanto diferencias genéticas como ambientales parecen influir en la variabilidad observada en los estudios<sup>(101-103)</sup>. Los anti-MuSK son predominantemente IgG4. En pacientes individuales las variaciones en los títulos se correlacionan con la gravedad de la enfermedad más que con los anti-RACH<sup>(104)</sup>.

La subclase IgG4 no activa la cascada del complemento, por no unirse al factor C1q, a diferencia de las IgG1 e IgG3 en la miastenia anti-RACH+ que provoca destrucción de los RACH mediada por complemento. Otras características propias de la IgG4 humana es que supone menos del 5% del total de IgG, tiene una capacidad débil de unirse al receptor-Fcγ y por tanto no es un activador potente de las células inmunes o de la citotoxicidad mediada por células, pero tiene la propiedad única de recombinar semi-anticuerpos con otras moléculas de IgG4 (**Figura 15**). Esto produce anticuerpos híbridos que son biespecíficos y por tanto no entrecruzan antígenos idénticos<sup>(90,105)</sup>.

**Figura 15.**



*Adaptado de Stone y cols. NEJM 2012(106)*

Teniendo en cuenta dichas propiedades, la IgG4 se ha descubierto responsable de varias enfermedades autoinmunes, incluyendo el pénfigo<sup>(107)</sup>, la glomerulonefritis membranosa idiopática con anticuerpos contra receptores de fosfolipasa A2 tipo M<sup>(108)</sup>, y la púrpura trombótica trombocitopénica con anticuerpos contra la metaloproteína ADAMTS13<sup>(109)</sup>. Excepto en el caso del pénfigo, la patogenicidad de las IgG4 antígeno-específicas en estos trastornos no se ha demostrado experimentalmente.

MuSK es un polipéptido transmembrana de la terminal muscular que está implicado en las vías de señalización que mantienen la integridad funcional de la UNM. Al parecer los anti-MuSK alteran el mantenimiento de los agregados de RACH en la terminal muscular, provocando una disminución del número de RACH funcionales<sup>(110)</sup>. También se ha demostrado que los anti-MuSK inhiben la proliferación de células musculares humanas y disminuyen la expresión de RACH y rapsin<sup>(111)</sup>. Además, en

modelos animales por inmunización con el ectodominio recombinante de MuSK se ha logrado reproducir la debilidad miasténica<sup>(112)</sup> y el primer estudio en ratones por transferencia pasiva ya indicaba que los anti-MuSK eran el factor patogénico<sup>(113)</sup>. Éste y otros experimentos con IgG MuSK+ han sugerido que los anticuerpos activan e internalizan MuSK, lo que posteriormente lleva a una reducción y dispersión de los RACH agregados en la UNM<sup>(114)</sup>.

Más recientemente se ha realizado transferencia pasiva de las fracciones de IgG4 e IgG1-3 purificadas del plasma de pacientes con miastenia MuSK+ a ratones NOD/SCID. Estos ratones son inmunodeficientes porque no tienen células linfoides funcionales y tienen un sistema de complemento defectuoso. Las IgG4 y no las IgG1-3 provocaron debilidad muscular grave, debida a defectos funcionales combinados pre- y post-sinápticos de la UNM<sup>(115)</sup>. Este estudio demuestra que las IgG4 anti-MuSK son directamente miastenogénicas, independientemente de los componentes adicionales del sistema inmune.

### Anticuerpos en miastenia con timoma y miastenia de inicio tardío

Algunos pacientes con miastenia tienen anticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares concentrados en la UNM. Su reactividad sobre secciones de músculo cardíaco o esquelético da lugar a un patrón estriado-cruzado (cross-striational). Reconocen epítomos de proteínas del músculo esquelético como miosina, actina,



actinina y filamina. Dos tipos de anticuerpos, dirigidos contra titina<sup>(116)</sup> y receptor de rianodina<sup>(117)</sup>, se encuentran en hasta el 95% de pacientes con miastenia y timoma y en el 50% de pacientes con miastenia de inicio tardío<sup>(17)</sup>. Titina es la proteína más grande que se conoce, con un peso molecular de 3000 kDa, que se extiende a lo largo del sarcómero proporcionando un enlace directo entre la mecánica de la contracción muscular y la activación de genes musculares. Pero a pesar de su enorme tamaño y compleja estructura la mayoría de anticuerpos contra titina reconocen una región antigénica restringida, de 30 kDa, llamada MGT30<sup>(118)</sup>.

El receptor de rianodina es el canal de calcio del retículo sarcoplásmico. Se abre con la despolarización del sarcolema y participa en la contracción muscular mediante la liberación de calcio al citoplasma. Aunque los receptores cardiacos y musculares difieren antigénicamente los anticuerpos de los pacientes reaccionan con ambos tipos. Se han identificado varios epítomos en los extremos N y C terminales que se usan como péptidos antigénicos para la detección de estos anticuerpos mediante ELISA<sup>(117)</sup>. La presencia de anticuerpos anti-titina y anti-receptor de rianodina se asocia con una mayor gravedad de la enfermedad en pacientes con timoma o miastenia de inicio tardío<sup>(18)</sup>. Cuando se detectan en pacientes menores de 60 años sirven como indicadores de la presencia de timoma<sup>(42)</sup>.

Existen otros anticuerpos que reaccionan contra el canal de potasio voltaje-dependiente Kv1.4<sup>(119)</sup> que fueron detectados en el 18% de una serie de pacientes

japoneses que presentaban síntomas bulbares, crisis miasténicas, timoma, miocarditis y prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma. Sin embargo, a pesar de que en una serie europea también el 17% de pacientes tenía anti-Kv1.4, el fenotipo correspondiente era muy distinto, siendo en su mayoría mujeres con miastenia de inicio tardío y síntomas leves<sup>(120)</sup>.

Pero los anticuerpos anti-músculo estriado no se suelen encontrar en pacientes con miastenia sin anti-RACH y tampoco existe evidencia de que puedan realmente provocar cambios estructurales en el músculo esquelético. El papel de estos anticuerpos en la patogénesis y su contribución a los síntomas clínicos de la miastenia no está demostrado.

### Miastenia seronegativa

Aproximadamente el 10% de pacientes con miastenia no tienen anticuerpos anti-RACH o anti-MuSK detectables con los métodos habituales, este grupo se conoce como miastenia seronegativa<sup>(102)</sup>. Los pacientes con miastenia ocular tienen menos probabilidad de tener anti-RACH, y hasta el 50% de ellos son seronegativos.

Anteriormente se habían reportado evidencias de que en la miastenia seronegativa la debilidad muscular se produce por autoanticuerpos patogénicos: los pacientes se

benefician del recambio plasmático, se ha reproducido la debilidad miasténica en un bebé por contacto transplacentario con la madre afecta<sup>(121)</sup>, y la inmunización pasiva de ratones con el suero de pacientes es capaz de inducir defectos en la transmisión neuromuscular<sup>(83,122,123)</sup>. No obstante, cabe resaltar que estos estudios fueron previos al descubrimiento de MuSK.

Desde el punto de vista clínico y demográfico la miastenia seronegativa es muy similar a la miastenia RCh+ pero el diagnóstico y el manejo clínico de estos pacientes se ve dificultado porque no se dispone de un biomarcador. En los últimos años las investigaciones en este sentido han dado lugar a dos tipos de hallazgos, los anticuerpos llamados de baja afinidad y un nuevo antígeno de la UNM, LRP4.

### **1. Anticuerpos de baja afinidad**

En 2008 se describieron por primera vez los anticuerpos de baja afinidad contra el RCh, presentes en el 66% de pacientes con miastenia seronegativa<sup>(124)</sup>. Estos anticuerpos son del subtipo IgG1 y se detectaron mediante un ensayo celular utilizando células HEK293, una línea celular humana, cotransfectadas con las cuatro subunidades del RCh y rapsina, para favorecer su agregación en la superficie celular. En 2012 los mismos autores publicaron que hasta el 50% de pacientes con miastenia seronegativa, generalizada u ocular, tienen estos anticuerpos contra RCh agregados y que correlacionan con las características electrofisiológicas<sup>(125)</sup>, atribuyéndoles un

mecanismo patogénico similar a la miastenia RCh+. Sin embargo, los anticuerpos contra RCh agregados se dirigen contra la forma adulta del RCh y no se unen a la forma fetal, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de pacientes con anti-RCh que se unen a ambas formas. Un ensayo celular similar aplicado a MuSK aumentó la detección de anti-MuSK en pacientes seronegativos y, curiosamente, encontró anti-MuSK en dos casos de miastenia ocular<sup>(126)</sup>.

La diferencia entre las cohortes estudiadas y los sueros utilizados no permite estimar de forma acertada el porcentaje de pacientes que son positivos para estos anticuerpos de baja afinidad.

## **2. Anticuerpos anti-LRP4**

Tres grupos de investigación diferentes han identificado la presencia de anticuerpos contra LRP4, principalmente en pacientes con miastenia seronegativa<sup>(127-129)</sup>, descubriendo un nuevo autoantígeno en miastenia y reduciendo el porcentaje de pacientes seronegativos restantes. Lo cierto es que no existe un método adecuado que permita la detección de rutina de estos anticuerpos. Además, el porcentaje de pacientes positivos encontrados varía de forma sorprendentemente amplia, entre el 2 y el 46%, en los estudios publicados. Estas diferencias pueden deberse a los métodos utilizados, la fuente de LRP4, el estado conformacional del antígeno (en su forma

nativa versus potencialmente desnaturalizado) y/o diferencias étnicas (japoneses versus caucásicos; lo cual ocurre de echo en la miastenia MuSK+) (Tabla 4).

**Tabla 4. Detección de anti-LRP4 en pacientes con miastenia seronegativa.**

Estudio	Pacientes seronegativos testados	Pacientes seronegativos anti-LRP4+		País	Método	Fuente de LRP4
Higuchi y cols.	272	6	2.2%	Japón	Inmunoprecipitación con LRP4-ECD	Ratón
Pevzner y cols.	13	6	46.1%	Alemania	Ensayo celular con LRP4 intacto	Humano
Zhang y cols.	120	11	9.2%	Grecia y EEUU	ELISA con LRP4-ECD	Rata

ECD: dominio extracelular

*Adaptado de Zisimopoulou y cols.*

LRP4 es el receptor de agrin y por lo tanto activador de MuSK<sup>(130)</sup>. Su función es fundamental para la formación de la UNM, como se demuestra en los ratones LRP4 -/- los cuales carecen de agregados de RACH y mueren al nacer por parada respiratoria. Este fenotipo es similar al de los ratones knock-out para MuSK o agrin. LRP4 puede formar un dímero y activar MuSK directamente en la superficie de la membrana muscular post-sináptica, y junto a Dok-7, resulta fundamental para la activación de esta kinasa.

El mecanismo patogénico propuesto en la miastenia con anti-LRP4 es que estos anticuerpos inhiben la interacción entre agrin, LRP4 y MuSK, puesto que *in vitro* el

siero de los pacientes interfiere con la unión de agrin y altera la agregación de los RACH. Por otro lado, los anti-LRP4 podrían unir complemento y causar destrucción de la terminal motora, de forma similar a la miastenia RACH+. En uno de los estudios se determinó la subclase de anticuerpos de sólo 4 pacientes, encontrándose que en su mayoría era IgG1<sup>(127)</sup>. Sin embargo uno de los 4 sueros también contenía una alta concentración de IgG4. Este hallazgo abre la posibilidad de que las IgG4 anti-LRP4 sean también frecuentes, como en el caso de la miastenia MuSK+, con un papel patogénico similar. Algo que tienen en común es que MuSK y LRP4, al contrario que el RACH, no están directamente involucradas en la transmisión sináptica de la UNM pero son proteínas con un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la sinapsis<sup>(130)</sup>. Por ejemplo, la alteración en la señalización de agrin ocasiona UNM menos estables, con RACH más dispersos y no agregados, como es el caso de los síndromes miasténicos congénitos por mutaciones de agrin<sup>(131)</sup> y también en los ratones knock-out de agrin<sup>(132)</sup>.

Por ahora, no está claro si los anticuerpos anti-LRP4 causan defectos en la transmisión neuromuscular y debilidad muscular en los pacientes. Su papel patogénico aún está por demostrar.

Parece evidente que la miastenia RACH+ y la miastenia MuSK+ son dos condiciones autoinmunes diferentes que a pesar de compartir muchos síntomas clínicos tienen una fisiopatología distinta (**Tabla 5**).

**Tabla 5. Comparación de pacientes con miastenia RACH+ y MuSK+.**

Hallazgos en los pacientes		Anti-RACH	Anti-MuSK
<b>Síntomas</b>			
	Debilidad miembros	++	+
	Bulbar	+	++
	Ocular	++	+
	Facial y atrofia lingual	+/-	+
	Insuficiencia respiratoria	+	++
<b>Respuesta a piridostigmina</b>		80-90%	30-50%
<b>Electrofisiología</b>			
	ER miembros	70-80%	35-50%
	ER facial	80-90%	80%
	FA miembros	95%	15-50%
	FA orbicular ojos	95-99%	72%
<b>Patología tímica</b>			
	Hiperplasia	65%	10-15%
	Timoma	10%	anecdótico

ER: estimulación repetitiva      FA: electromiografía de fibra aislada

*Adaptado de Díaz-Manera y cols. Nat Clin Pract Neurol 2007(133)*

Es necesario continuar la investigación sobre las características fenotípicas de los pacientes con anticuerpos de baja afinidad, anti-LRP4 y seronegativos para facilitar el diagnóstico e intentar mejorar el tratamiento de estos subgrupos de pacientes. El estudio de los mecanismos fisiopatológicos de los diferentes subtipos de miastenia allanará el camino hacia el desarrollo de nuevas terapias que sean más antígeno/anticuerpo/paciente específicas.





## **II. HIPÓTESIS**

1. Rituximab es una terapia eficaz para el tratamiento de los pacientes con miastenia refractaria a los tratamientos inmunosupresores convencionales.
2. Los pacientes con miastenia seronegativa son un grupo heterogéneo desde el punto de vista clínico e inmunológico. En su patogenia intervienen anticuerpos frente a diversos antígenos de la UNM no conocidos.



### **III. OBJETIVOS**

#### **I. Respuesta al tratamiento inmunosupresor con Rituximab en pacientes con miastenia refractaria.**

- Determinar la respuesta a largo plazo al tratamiento con Rituximab de pacientes con miastenia refractaria a otros tratamientos inmunosupresores.
- Comparar la respuesta clínica e inmunológica de pacientes con miastenia RACH+ y pacientes con miastenia MuSK+.

#### **II. Búsqueda de nuevos autoanticuerpos en miastenia seronegativa.**

- Investigar la presencia de autoanticuerpos frente a antígenos de la UNM en pacientes con miastenia seronegativa.
- Identificar los antígenos no conocidos mediante la utilización de técnicas novedosas.



## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **I Respuesta al tratamiento inmunosupresor con Rituximab en pacientes con miastenia refractaria.**

#### **1. PACIENTES:**

Con el fin de determinar si el tratamiento con Rituximab es efectivo y si la respuesta obtenida es duradera se trataron 17 pacientes, 6 con miastenia MuSK+ y 11 con miastenia RACH+. Todos los pacientes tenían miastenia refractaria a los tratamientos convencionales y clínicamente estaban entre Clase III y V de la clasificación de la MGFA. Nuestro protocolo de tratamiento estándar incluye prednisona como fármaco de primera línea. Si la respuesta no es adecuada o son necesarias dosis superiores a 40 mg a días alternos pasamos a fármacos inmunosupresores de segunda línea, en primer lugar azatioprina, seguida de ciclosporina y finalmente micofenolato o tacrolimus(70). Definición de miastenia refractaria: Se consideran pacientes refractarios al tratamiento aquellos que no presentan una mejoría clínica significativa tras recibir prednisona y haber probado al menos 3 fármacos de segunda línea.

#### **2. TRATAMIENTO:**

Los 17 pacientes recibieron el siguiente régimen terapéutico: se administró Rituximab a una dosis de 375 mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal, semanalmente durante 4 semanas consecutivas, y posteriormente una infusión mensual durante 2 meses. Se

administraron dosis repetidas de Rituximab sólo si reaparecían síntomas miasténicos que interfiriesen con las actividades de la vida diaria de los pacientes.

### **3. EVALUACIÓN CLÍNICA:**

Determinamos el estado post-intervención de la MGFA cada 3 meses y registramos los cambios en el tratamiento habitual de los pacientes. Se consideró mejoría (Improvement) si su estado cambiaba de MGFA Clase IV o V a Clase IIIA o II; o si pasaba de Clase III a Clase II.

### **4. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS:**

Se extrajeron muestras de sangre de los pacientes antes de la infusión y cada 3 meses durante el primer año de seguimiento tras el tratamiento con Rituximab. A partir de ese momento, se extrajeron muestras de sangre al menos 2 veces al año. Los títulos de anticuerpos anti-RACH y anti-MuSK fueron determinados a la vez, en un único experimento, a partir de las muestras almacenadas para evitar variabilidad en la técnica, como previamente había reportado nuestro grupo en otra publicación(134). La variación de los títulos de anticuerpos en un mismo paciente se expresó como porcentaje de descenso o aumento comparado con los niveles pre-tratamiento.

### **5. ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS E INMUNOGLOBULINAS:**

Se analizaron las subpoblaciones de linfocitos (células B y T) y los niveles totales de inmunoglobulinas antes y después del Rituximab. Para determinar el efecto de

Rituximab sobre las células plasmáticas de larga duración, empleamos un ELISA para medir las IgG contra la toxina anti-tetánica (ATT) según las instrucciones del fabricante (Binding Site, Birmingham, Reino Unido). Para el estudio de anticuerpos anti-MuSK de las subclases IgG1 e IgG4 en 5 de los 6 pacientes con miastenia MuSK+, empleamos un ELISA como había descrito previamente en otra publicación nuestro grupo de colaboración holandés(104).

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En el estudio estadístico, analizamos las diferencias entre el grupo con miastenia MuSK+ y RCh+ mediante los test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y análisis de varianza (ANOVA). La duración de la respuesta a Rituximab se estudió generando una curva de supervivencia de Kaplan-Meier.

## **7. APROBACIONES**

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en el mismo. Obtuvimos el permiso para el uso compasivo de Rituximab del Ministerio de Sanidad español, ya que esta medicación no está aprobada para su uso regular en pacientes con miastenia.

## **II Búsqueda de nuevos autoanticuerpos en miastenia seronegativa.**

### **1. PACIENTES**

En este proyecto incluimos suero procedente de 93 pacientes con miastenia seronegativa y 104 pacientes con miastenia seropositiva (71 anti-RACH+ y 33 anti-MuSK+), procedentes del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (115 pacientes) y del Leiden University Medical Centre de Holanda (82 pacientes). Como controles se utilizaron sueros procedentes de 112 pacientes con otras enfermedades neurológicas: 30 pacientes con síndrome de Lambert-Eaton (LEMS), de ellos 19 tenían anticuerpos contra canales de calcio voltaje dependiente (VGCC) y 11 eran seronegativos; 20 pacientes con polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), 10 con síndrome de Guillain-Barré (SGB), 8 con neuropatía motora multifocal, 24 con esclerosis múltiple (EM), 10 con neuromielitis óptica (NMO) y 10 con esclerosis lateral amiotrófica. Además también se incluyeron 10 controles sanos y 37 pacientes con otras enfermedades autoinmunes: 13 con lupus, 8 con artritis reumatoide, 5 con síndrome de Sjögren, 3 con enfermedad mixta del tejido conectivo, 3 con polimiositis, 3 con síndrome de Raynaud y 2 con esclerodermia. La información clínica correspondiente y el consentimiento informado fueron obtenidos por el médico tratante en cada caso. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.



## 2. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Como primer paso para la identificación de nuevos antígenos diana en miastenia seronegativa, determinamos la reactividad del suero de los pacientes contra la UNM de ratón. Para este experimento inicial incluimos suero de 18 pacientes con miastenia seronegativa que fueron elegidos en base a una historia clínica detallada y haber resultado negativos de forma repetida para la detección de anticuerpos anti-RACH y anti-MuSK con métodos comerciales. Como controles positivos de autoinmunidad post-sináptica de la UNM utilizamos 3 sueros de pacientes con anticuerpos anti-RACH y 3 de anti-MuSK; para control de autoinmunidad pre-sináptica utilizamos 4 sueros de pacientes con LEMS. Como controles negativos incluimos 9 sueros más: 5 pacientes con otras enfermedades autoinmunes y 4 controles sanos. Esta técnica la aprendimos en la Universidad de Pennsylvania, Filadelfia, Estados Unidos, en el laboratorio de la Dra. R. Balice-Gordon.

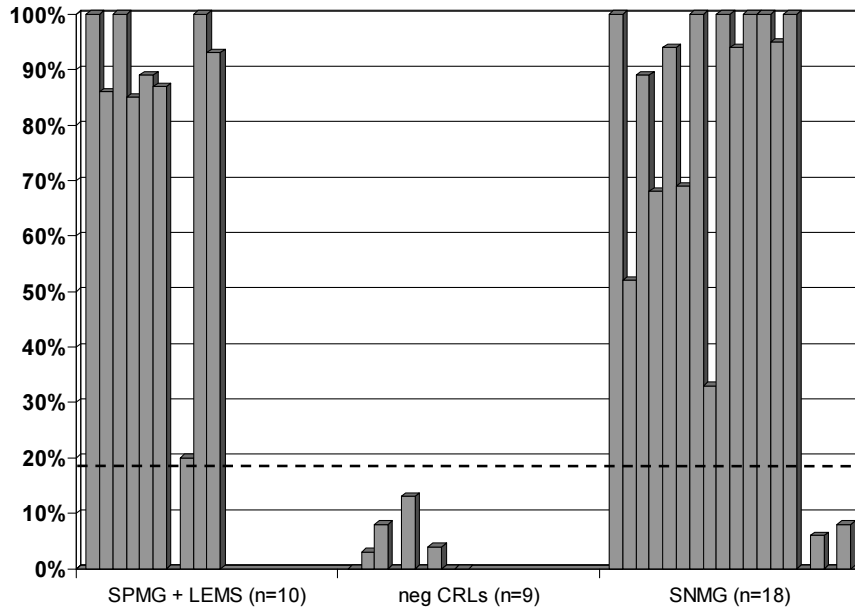
Para confirmar la inmunoreactividad del suero contra la UNM, disecamos músculo esternomastoideo de ratones de 2 meses, hembras tipo C57/black/6J. Los animales eran sedados con 100U/100g Ketamine/xylazine (Hospira. Lake Forrest, Illinois, Estados Unidos). El tejido muscular se fijaba por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 2% (en tampón fosfato salino, PBS) durante 15 minutos y después se lavaba durante 1 hora mientras se limpiaba de tejido conectivo bajo una lupa de disección. Más tarde, el tejido muscular se exponía durante 15 minutos a BTX conjugada con tetra-methylrhodamina diluida en PBS 1:5000 (Molecular Probes, Life Technologies),

se bloqueaba con suero de cabra al 5% en PBS durante 1 hora, y posteriormente se incubaba con el suero de paciente o de control 1:100 en solución de bloqueo durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente el tejido muscular se limpiaba de los anticuerpos no unidos mediante inmersión en solución de bloqueo durante 2 horas en agitación, cambiándola frecuentemente. Y para la detección de las IgG unidas se incubaba durante 4 horas con el anticuerpo goat-anti-human total IgG Alexa Fluor 488 1:500 (Molecular Probes). Finalmente se limpiaba extensamente mediante lavados en PBS y las fibras musculares se disecaban bajo la lupa y se montaban utilizando medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos).

Las imágenes se captaban con microscopio de epifluorescencia usando el software Zeiss Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY). También, una parte representativa de ellas se capturaron con microscopio confocal (Leica TCS SP2, Heidelberg, Alemania) a velocidad de escaneo de 400 Hz y se crearon proyecciones máximas mediante Leica application suite 2.0 para visualizar las UNM completas.

Con el fin de cuantificar la reactividad del suero contra la UNM, contamos las UNM de superficie basándonos en la tinción de BTX y calculamos el porcentaje de UNM que se marcaban con el suero en ese mismo plano. Determinamos la reactividad basal de la UNM utilizando las 9 muestras control. Todos los sueros que mostraron inmunoreactividad contra la UNM mayor de la basal más tres desviaciones estándar se consideraron positivos para autoinmunidad de UNM. Todos los sueros RACH+ y

MuSK+, así como 3 de los 4 LEMS y 14 de los 18 sueros de miastenia seronegativa mostraron reactividad contra la UNM (**Figura 16**).



**Figura 16. Cuantificación de la inmunorreactividad del suero sobre UNM.**

*El eje Y muestra el porcentaje de UNM inmunomarcadas por las muestras de suero. El valor de corte para considerar la reactividad como positiva fue de 18% de UNM marcadas (línea discontinua). Los sueros RACH+ (3) y MuSK+ (3) y 3 de los 4 sueros LEMS mostraron una reactividad significativa contra la UNM comparado con los controles negativos (9). De los 18 sueros seronegativos 14 mostraron inmunorreactividad significativa y 4 fueron negativos.*

### 3. INMUNOFLUORESCENCIA SOBRE CULTIVO DE MIOTUBOS

Para explorar la posible reactividad de los sueros de pacientes con miastenia seronegativa contra antígenos post-sinápticos de la UNM, utilizamos cultivos de miotubos murinos enriquecidos en placas motoras aneurales(135). Para ello,

cultivamos la línea celular de mioblastos primarios de ratón C2C12 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, Estados Unidos) con el medio apropiado (Dulbecco's Modified Eagle Medium con HydroxyEthyl-PiperazineEthane-Sulfonic acid 25 mM, FBS al 10% y 1% de penicilina, estreptomycin y fungizona). Para que los RACH no se expresaran de forma dispersa en la membrana de los mioblastos, sino agregados, como ocurre en las placas motoras inervadas, los cubreobjetos introducidos dentro de las placas de cultivo se pre-trataron con una solución de Laminina EHS a concentración de 10 µg/ml (Invitrogen, Life Technologies) en medio L-15 suplementado con NaCOH<sub>3</sub> al 0.2%, durante la noche en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para inducir la diferenciación de los mioblastos a miotubos el medio de cultivo se cambiaba a las 48h a medio con FBS al 5%.

La inmunofluorescencia se realizaba a los 6 días post-diferenciación; los miotubos fusionados se incubaban durante una hora a 37°C con suero de paciente o de control a 1:75 en medio de cultivo. Posteriormente las placas se lavaban con PBS e incubaban con BTX conjugada con Alexa 488 (1:250, Invitrogen) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después las células se lavaban y fijaban con PFA al 4% para posteriormente ser incubadas con el anticuerpo secundario Goat anti-human IgG Alexa 594 (1:1000) durante una hora. Como controles de inmunoreactividad en este tipo de placas motoras aneurales en cultivo, utilizamos dos de los sueros de pacientes con miastenia seropositiva que habíamos utilizado previamente para los estudios

inmunohistoquímicos (uno anti-RACH+ y otro anti-MuSK+), así como uno de los sueros control negativo.

#### **4. INMUNOFLUORESCENCIA SOBRE CULTIVO DE NEURONAS**

Para explorar la posible reactividad de los sueros de pacientes con miastenia seronegativa contra antígenos pre-sinápticos de la UNM, utilizamos cultivos de neuronas hipocampales de embrión de rata. La observación de que los sueros de los pacientes con LEMS, que utilizábamos como control positivo de autoinmunidad pre-sináptica y que tenían anticuerpos anti-VGCC, tenían reactividad contra la superficie de neuronas hipocampales disociadas, nos llevó a explorar la posibilidad de que los sueros sin anticuerpos conocidos pero con reactividad sobre la UNM pudiesen reaccionar contra otras proteínas de membrana también presentes a la vez en la terminal nerviosa motora y en neuronas hipocampales.

Se siguió el protocolo de disección y cultivo de neuronas descrito en el artículo del Dr. Dichter(136). Los hipocampos eran disecados a partir de embriones procedentes de ratas Wistar (E18) y las células disociadas y cultivadas durante 21 días en medio Neurobasal, suplementado con B27 (ambos de GIBCO, Life Technolgies). Para realizar la inmunofluorescencia el suero de paciente o de control (1:200) se incubaba in vivo con las neuronas durante una hora. Posteriormente las células se fijaban con PFA al 4% durante 5 minutos e incubaban con el anticuerpo secundario (goat anti-human IgG

Alexa 488 1:1000); después los cubreobjetos se lavaban y montaban sobre portaobjetos para su visualización en el microscopio de fluorescencia.

## **5. INMUNOPRECIPITACIÓN**

Los sueros de pacientes con miastenia seronegativa que resultaron positivos sobre cultivos de neuronas se utilizaron para inmunoprecipitar el antígeno diana, utilizando el método descrito en el artículo del Dr. J. Dalmau(137). Las neuronas hipocampales se sembraban en placas de 10 cm a densidad de  $10^6$  neuronas por placa y a los 21 días de cultivo se incubaban con el suero de paciente o de control (1:100) durante una hora a 37°C. Posteriormente las neuronas se lavaban con PBS y lisaban con tampón de lisis (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 100 mM, deoxycholate acid 0.5%, Triton X-100 1%, pH 7.5) con inhibidor de proteasas (Sigma Labs, St. Louis, MO, Estados Unidos). Tras centrifugar el lisado a 16000 g durante 20°C a 4°C, se recogía el sobrenadante e incubaba con bolas de proteína A/G agarosa (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) durante la noche a 4°C. Tras centrifugar de nuevo, las bolas que contenían los anticuerpos del paciente unidos al antígeno diana de la superficie neuronal, eran resuspendidas en tampón Laemmli (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos) y hervidas durante 5 minutos.

Las muestras tanto del paciente como del control se sometían a electroforesis en un gel de SDS y acrilamida al 4-15%. Las proteínas del gel se visualizaban mediante

tinción con Colloidal Blue Staining (Invitrogen) y las bandas que diferían respecto al control, que podrían corresponder a las proteínas precipitadas por el suero del paciente, se recortaban del gel y analizaban por espectrometría de masas en el servicio de proteómica del Hospital Vall d'Hebron.

## **6. ARRAY DE PROTEINAS HUMANAS**

Para tratar de detectar potenciales biomarcadores autoantigénicos en los sueros de miastenia seronegativa utilizamos como método innovador un array de proteínas (ProtoArray v5.0 Invitrogen). Este microarray contiene más de 9000 proteínas humanas, en una forma similar a las proteínas de células mamíferas, respecto a plegamiento de las proteínas y modificaciones post-translacionales. Esta propiedad permite teóricamente la detección de interacción entre proteínas a un nivel funcional. Cada open reading frame humana se expresa como una proteína de fusión GST N-terminal usando un sistema de expresión de baculovirus, purificado de células de insecto e impreso por duplicado en una placa de vidrio pre-tratada con nitrocelulosa. Los controles internos ya están impresos en cada array para servir de control del fondo y de la detección de señales. Tras el análisis de los resultados, el software genera una lista de proteínas humanas que muestran interacciones significativas con la muestra. Esta técnica se realizó en la plataforma de estudios translacionales de la Universidad de Pennsylvania en colaboración con los Drs. J. Dalmau y M. Kalos,

En nuestro estudio mezclamos en 2 tubos diferentes 6 muestras de sueros seronegativos, agrupadas de 3 en 3, que habían resultado positivas en los estudios previos de inmunohistoquímica y se diluyeron 1:500 en solución de lavado. El microarray se bloqueó con solución de bloqueo según las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero se incubaron en el array y se detectaron con el anticuerpo goat-anti-human IgG Alexa 647, en un escáner de microarray fluorescente. Las imágenes adquiridas fueron analizadas mediante el software recomendado. El análisis de los datos normalizados destacaron Cortactin transcript variant 2 como un autoantígeno candidato.

## **7. ENSAYO CELULAR**

Para validar Cortactin como un posible nuevo antígeno diana en pacientes con miastenia seronegativa, estudiamos la reactividad del suero de los pacientes utilizando células HEK293 transfectadas. El cDNA de Cortactin, subclonado en el vector pcDNA3 FLAG 2AB, lo proporcionó el Dr. Thomas Parsons de la University of Virginia, Estados Unidos. Las células HEK293 se cultivaron sobre cubreobjetos colocados dentro de la placa de cultivo y a las 24 horas se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al día siguiente las células transfectadas se fijaban con PFA al 4% durante 10 minutos, se permeabilizaban con Triton X-100 al 0.3% en PBS y luego se bloqueaban con suero de cabra al 5% durante una hora.



A continuación las células se incubaban con suero de paciente o de control a 1:20 en solución de bloqueo, y después con un anticuerpo monoclonal contra Cortactin a 1:15000 (Millipore, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) durante 1 hora a temperatura ambiente. La reactividad se revelaba mediante incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (goat anti-human IgG Alexa 488 y goat anti-mouse IgG Alexa 594, Molecular Probes, ambos a 1:1000) y los cubreobjetos se montaban con Vectashield con DAPI (para teñir también los núcleos de las células). Los resultados se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51, Tokyo, Japón) y las imágenes se capturaron con la cámara digital (Olympus DP72).

## **8. INMUNOBLOT**

Para la obtención de extractos celulares, se cultivaron células HEK293 en placas de cultivo de 10 cm y se transfectaron con el plásmido de cortactin o con un vector vacío cuando estaban al 80-90% de confluencia, siguiendo el protocolo de Lipofectamina. Al día siguiente las células se lavaron con PBS, se rascaron y alicuotaron rotulando de forma precisa los extractos de células transfectadas o no transfectadas. Los pellets se pesaban y guardaban congelados a -80°C hasta su homogenización con 19 volúmenes de tampón de tratamiento de electroforesis (Urea 4 mol/L, 4% SDS)(138), para ser cargados en geles de poliacrilamida y sodium-dodecyl-sulfate (SDS) a concentración 4-10%.

Tras la electroforesis las proteínas se transferían a una membrana de nitrocelulosa y se teñían de forma transitoria con Ponceau para visualizar las bandas y cortar la membrana en tiras. Después de bloquear con leche descremada al 5% en PBS durante 1 hora, cada tira se incubaba durante la noche a 4°C con suero de paciente o de control, diluido 1:100 en leche al 3%, y además con un anticuerpo monoclonal contra un control endógeno, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) a 1:4000 (Ambion, Life Technologies) para control de la carga proteica. En cada experimento, usamos una tira como control positivo de transfección, incubada con el anticuerpo comercial contra Cortactin a 1:30000 (Millipore) y anti-GAPDH. Posteriormente, las tiras se lavaban con leche al 3% y se incubaban con los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente: goat anti-mouse IgG peroxidase a 1:1000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, Estados Unidos) y policlonal rabbit anti-human IgG HRP a 1:300 (Dako, Glostrup, Dinamarca). La reactividad de las bandas de proteínas se reveló con el método de diaminobenzidina (Impact DAB, Vector Laboratories) y los resultados se escanearon para guardar las imágenes digitalizadas.

En otra serie de experimentos, para confirmar los casos positivos y comparar con los cuestionables, los geles se cargaban con extracto de células HEK293 transfectadas con Cortactin o no transfectadas en pocillos alternos, y así posteriormente el suero del mismo paciente se incubaba con las dos tiras para comprobar si la banda observada

era específica (debía observarse en la de células transfectadas y desaparecer en la de no transfectadas).

## **9. ELISA**

Para intentar establecer una técnica de detección de anticuerpos contra Cortactin con la que poder realizar el despistaje de gran número de muestras, utilizamos un ELISA a partir de proteína recombinante adquirida comercialmente (H00002017-P01 Novus Biologicals, Littleton, CO, Estados Unidos). Las placas de ELISA se lavaban con PBS e incubaban con la proteína recombinante, 0.5 µg por pocillo, durante la noche a 4°C en agitación suave. Al día siguiente las placas se lavaban con PBS y bloqueaban con leche descremada al 10% durante una hora a temperatura ambiente. Después de volverlas a lavar se incubaba el suero de paciente o de control a una dilución 1:100 durante una hora y posteriormente el anticuerpo secundario rabbit anti-human IgG HRP (Dako) a 1:3000, otra hora. Como sustrato cromogénico se utilizaba tetrametilbenzidina (TMB reagent set) según las instrucciones del fabricante (BioLegend, San Diego, CA, Estados Unidos) y la reacción colorimétrica se paraba con ácido sulfúrico al 25%, antes de leer los resultados en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Como control de la reacción inespecífica de las muestras con la placa, la mitad de los pocillos se incubaban con BSA al 2% en lugar de con la proteína recombinante, y todas las muestras se hacían por duplicado. A la hora de leer los resultados se restaba el

valor de densidad óptica obtenido en una condición del de la otra. Como control positivo un pocillo se incubaba con el anticuerpo comercial contra Cortactin a 1:10000 (Millipore), y para restar la señal procedente del anticuerpo secundario, otro pocillo era incubado sin suero.

## **V. RESULTADOS**

### **I. Respuesta al tratamiento inmunosupresor con Rituximab en pacientes con miastenia refractaria.**

Existe un subgrupo de pacientes con miastenia que no responde al tratamiento convencional, a pesar de la utilización de varios fármacos en combinación. Los pacientes con miastenia MuSK+ tienen una peor respuesta a los tratamientos habituales que los pacientes con miastenia RACH+(139). Recientemente se ha reportado que Rituximab es eficaz para tratar casos de miastenia refractaria (101,134), sin embargo se desconoce la evolución a largo plazo pues los casos reportados incluyen un seguimiento corto. Además, no se ha comparado la respuesta al tratamiento inmunosupresor entre los diferentes subtipos de miastenia. En este estudio describimos el seguimiento clínico e inmunológico de un grupo de pacientes con miastenia refractaria tratados con Rituximab.

En un periodo de 5 años (2005-2010) tratamos con Rituximab 17 pacientes con miastenia refractaria a tratamientos convencionales. La edad media en el momento de la infusión era de 44.3 años y 15 eran mujeres. Seis pacientes tenían anticuerpos anti-MuSK y en cuanto a su clasificación clínica, 5 pacientes estaban en clase IVB y 1 en clase V. Los 11 pacientes restantes tenían anticuerpos anti-RACH: 2 estaban en clase

IIIA, 2 en IIIB, 6 en IVB y 1 en V. El porcentaje de pacientes con miastenia farmacorresistente difería de manera significativa entre pacientes con miastenia MuSK+ (6/41) y miastenia RCh+ (11/399) (14.6% vs 2.7%,  $\chi^2 p < 0.004$ ).

La duración media de la enfermedad antes de la administración de Rituximab fue de 128 meses en el grupo con miastenia MuSK+ y 120 meses en el de miastenia RCh+. El tratamiento fue bien tolerado y el único efecto adverso fue enrojecimiento facial y una erupción cutánea generalizada durante la infusión en 2 pacientes que se resolvió con la administración de hidrocortisona parenteral. A partir de esta experiencia, los dos pacientes recibieron pre-medicación con hidrocortisona intravenosa y difenhidramina en las siguientes infusiones de Rituximab, sin presentar más problemas.

La mediana de tiempo de seguimiento fueron 31 meses (rango 4-60). De forma global 16 de los 17 pacientes mejoraron de forma significativa tras recibir Rituximab. No hubo diferencia en la respuesta observada en cuanto a duración de la enfermedad antes de que fuese indicado Rituximab. Sin embargo, la respuesta fue diferente cualitativamente entre los dos grupos, pues los pacientes con miastenia MuSK+ alcanzaron un estado de manifestaciones mínimas (MM) ya a los 3 meses después del tratamiento. Además, después de un seguimiento medio de 35 meses los pacientes con miastenia MuSK+ permanecían con MM (2 pacientes), estaban en remisión farmacológica (2 pacientes) o incluso en remisión completa (2 pacientes) y ninguno de ellos precisó más infusiones (**Tabla 6**). La dosis de prednisona se consiguió

disminuir significativamente después del Rituximab (dosis media antes del tratamiento: 49 mg/d; en la última visita de seguimiento: 6.5 mg/d), permitiendo retirar el resto de fármacos inmunosupresores. De los 11 pacientes con miastenia RACH+, 10 mejoraron a los 3 meses. Se pudo disminuir la dosis media de prednisona de 30.5 mg/día antes de Rituximab a 17.2 mg/d en la última visita de seguimiento, pero no hubo cambio significativo en los inmunosupresores de segunda línea. Seis de estos 10 pacientes precisaron reinfusiones de Rituximab como mediana a los 17 meses (rango 6-34) después de la primera dosis. A pesar de que los 10 mejoraron ninguno de los pacientes con miastenia RACH+ pasó a un estado de MM o remisión (Kaplan-Meier  $p=0.04$ ).

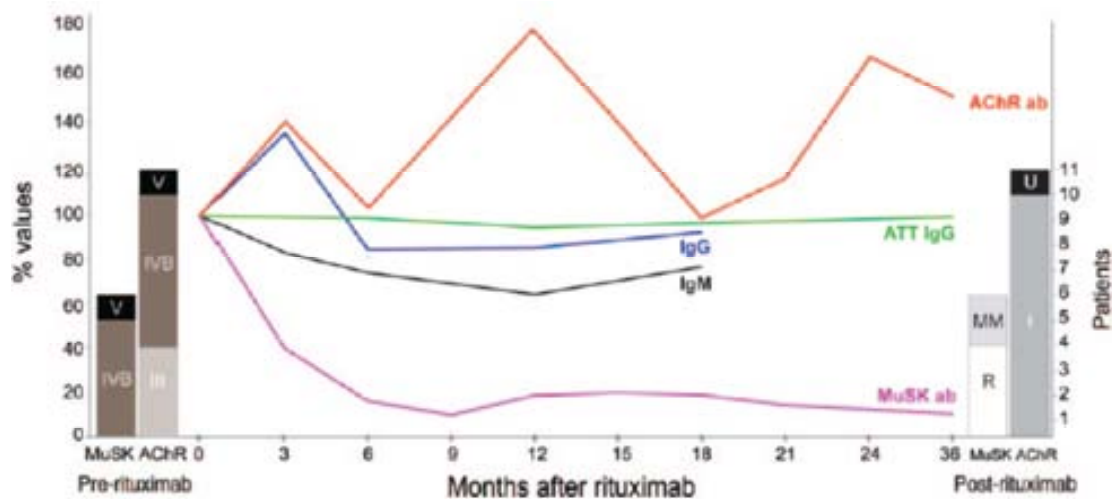
**Tabla 6. Datos de los pacientes antes de Rituximab y en la última visita de seguimiento.**

Patient	Sex	Antibody	Age at onset, y	Age when RTX was started, y	Treatment when RTX was started	MGFA when RTX was started	Follow-up, mo	Reinfusion	Treatment at last visit	Last visit MGFA	Ab titers when RTX was started	Last visit Ab titers
1	F	MuSK	34	52	MYC 2 g/d	IVB	60	0	None	CR	7.5 nM	Negative
2	F	MuSK	48	54	PR 70 mg/d, CYP 250 mg/d	IVB	55	0	PR 20 mg EOD	PR	50 nM	20 nM
3	F	MuSK	30	30	PR 70 mg EOD	V	53	0	None	CR	63 nM	Negative
4	F	MuSK	14	36	PR 40 mg EOD, MYC 2 g/d	IVB	34	0	PR 20 mg EOD	PR	250 nM	20 nM
5	F	MuSK	40	52	PR 40 mg/d	IVB	32	0	PR 5 mg EOD	MM-I	40 nM	0.5 nM
6	F	MuSK	39	45	PR 40 mg/d, TCR 5 mg/d	IVB	6	0	PR 20 mg EOD	MM-I	1.2 nM	Negative
7	M	ACHR	33	50	PR 60 mg EOD, CYP 250 mg/d	IVB	57	4	PR 30 mg EOD	I	262 nM	76 nM
8	F	ACHR	26	31	PR 80/40 mg	IVB	50	1	PR 60/10 mg	I	2,023 nM	860 nM
9	F	ACHR	67	73	PR 70 mg EOD	IVB	50	0	PR 35 mg EOD	I	88 nM	20 nM
10	F	ACHR	11	18	AZA 125 mg/d	IVB	37	1	AZA 125 mg/d	I	6,240 nM	31,000 nM
11	F	ACHR	32	53	PR 60/30 mg, CYP 200 mg/d	V	6	0	PR 50 mg EOD, CYP 200 mg/d	I	580 nM	430 nM
12	F	ACHR	10	14	PR 30 mg EOD, AZA 50 mg/d	IVB	14	0	PR 30 mg EOD, AZA 50 mg/d	I	215 nM	656 nM
13	M	ACHR	66	67	CYP 200 mg/d	IVB	4	0	CF 1 g/mo, PLE	U	49 nM	14 nM
14	F	ACHR	27	50	PR 20 mg/d, MTX 10 mg/wk	IIIA	24	4	PR 20 mg EOD	I	20 nM	20 nM
15	F	ACHR	37	43	PR 20 mg/d, AZA 150 mg/d	IIIA	22	1	PR 20 mg/d, TCR 4 mg/d	I	3.63 nM	20 nM
16	F	ACHR	26	35	PR 25 mg/d, AZA 150 mg/d	IIIB	11	0	PR 10 mg EOD	I	18.7 nM	420 nM
17	F	ACHR	35	51	PR 25 mg/d, AZA 150 mg/d	IIIB	14	4	PR 25 mg/d, AZA 150 mg/d	I	8 nM	20 nM

Abbreviations: Ab = antibody; AZA = azathioprine; CF = cyclophosphamide; CYP = cyclosporine; I = improvement; MGFA = Myasthenia Gravis Foundation America; MM = minimal manifestation; MTX = methotrexate; MYC = mycophenolate; PLE = plasma exchange; PR = prednisone; R = clinical or pharmacologic remission; RTX = rituximab; TCR = tacrolimus; U = unchanged.

A su vez, en el grupo de pacientes con miastenia MuSK+ los títulos de anticuerpos disminuyeron durante el seguimiento (**Figura 16**). Este descenso fue significativo ya a los 3 meses de la administración de la primera dosis (media 42.72%, ANOVA  $p=0.043$ ). De hecho, en la última visita de seguimiento se llegó a una disminución media de 86.7% en los títulos de anti-MuSK ( $p=0.002$ , ANOVA). En el grupo de pacientes con miastenia RACH+ los niveles de anticuerpos fueron variando y no disminuyeron de forma significativa a los 3 meses ni al final del seguimiento.

**Figura 16. Evolución clínica y serológica después del tratamiento con Rituximab.**

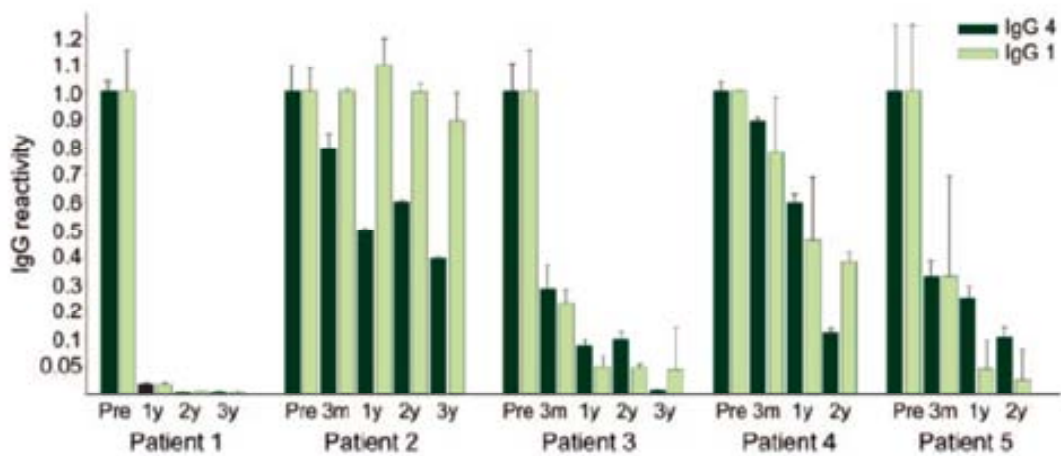


Todos los pacientes tratados con Rituximab mejoraron tras una media de seguimiento de 31 meses. El estado clínico de la MGFA antes del tratamiento y el estado post-intervención están representados en barras, una para el grupo MuSK+ y otra para el RACH+. I= mejoría, MM= manifestaciones mínimas, R= remisión, U= sin cambio. Los títulos medios de anticuerpos MuSK y RACH, las IgG e IgM totales, y las IgG específicas ATT están expresados como porcentaje de descenso o aumento. Se asigna un valor de 100% a los títulos antes de Rituximab.



Las células B periféricas se deplecieron completamente en los 17 pacientes 15 días después de la primera infusión, mientras que las subpoblaciones de células T permanecieron sin cambios. A los 3 meses del tratamiento, observamos una disminución del 20% en los niveles de IgM en todos los pacientes, mientras que los niveles de IgG no variaron de forma significativa. En concordancia con esto, tampoco se detectaron variaciones significativas en la reactividad de las IgG ATT tras la administración de Rituximab (Figura 16). En el estudio de las subclases específicas de IgG anti-MuSK, observamos una disminución significativa en la reactividad de IgG4 en todos los pacientes y de IgG1 en todos los pacientes menos uno (Figura 17).

**Figura 17. Progresión de la reactividad IgG 4 e IgG1 anti-MUSK después del Rituximab**



IgG4 and IgG1 anti-MuSK reactivity levels are represented by bars. We analyzed reactivity changes in 5 of the 6 patients every year after treatment. 3 m – 3 months after treatment; 1 y – 1 year after treatment; 2 y – 2 years after treatment; 3 y – 3 years after treatment; Pre – reactivity before rituximab.

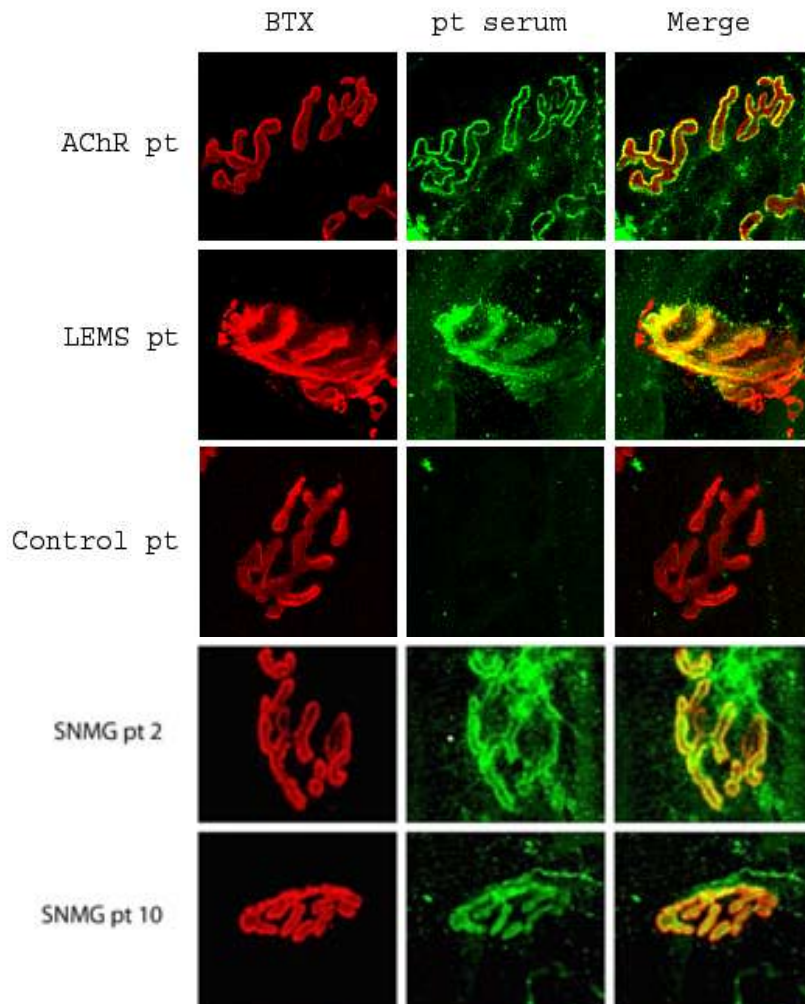
## **II. Búsqueda de nuevos autoanticuerpos en miastenia seronegativa.**

### **1. El suero de pacientes con miastenia seronegativa presenta inmunorreactividad contra la UNM de ratón.**

Para probar la naturaleza autoinmune de la miastenia seronegativa, examinamos la capacidad de los anticuerpos de los pacientes para unirse a la UNM de ratón. En este experimento primero establecimos cuáles eran los patrones inmunohistoquímicos de reactividad contra la UNM, utilizando sueros de pacientes con miastenia seropositiva, pacientes con LEMS y controles negativos. Todos los sueros con anticuerpos anti-RACH y anti-MuSK, así como 3 de los 4 sueros de LEMS mostraron reactividad contra la UNM con los patrones post y pre-sináptico correspondientes. Ninguno de los 9 sueros control, tanto de pacientes con otras enfermedades autoinmunes como controles sanos, resultó inmunorreactivo de forma significativa contra proteínas de la UNM. De entre los 18 sueros de miastenia seronegativa, 14 (78%) mostraron reactividad contra la UNM (**Figura 18**).

Sin embargo, 4 sueros de miastenia seronegativa y 1 de LEMS no mostraron inmunorreactividad significativa contra la UNM, a pesar de repetir la técnica en varias ocasiones.

**Figura 18. Patrones de inmunorreactividad del suero sobre la UNM.**

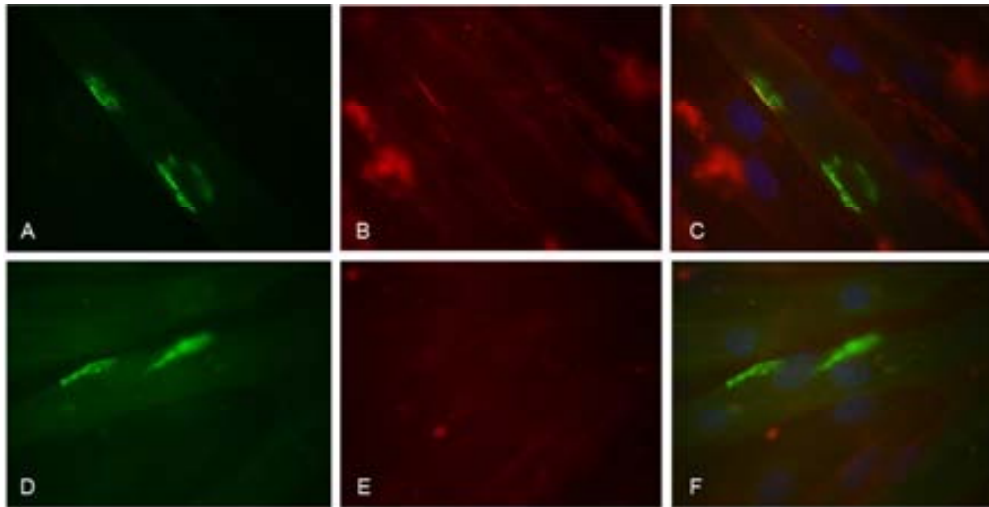


*Imágenes de confocal representativas de UNM (inmunohistoquímica de músculo de ratón). Tanto los sueros RACH+ y MuSK+ como LEMS mostraron una reactividad que se superponía con el marcaje de la BTX. Los controles negativos no mostraron reactividad contra las UNM. De los seronegativos, 14/18 sueros tenían un patrón similar al de los controles positivos.*

**2. No se observa inmunorreactividad significativa del suero de pacientes seronegativos sobre placas motoras de miotubos en cultivo.**

Para comprobar la reactividad de los sueros seronegativos contra antígenos post-sinápticos y poder establecer un sistema que nos permitiese aislarlos, examinamos la capacidad de los anticuerpos de los pacientes para unirse a placas motoras de miotubos en cultivo. Tomando como referencia la tinción de BTX observada a lo largo de la superficie de los miotubos, tratamos de establecer un patrón de reactividad para los sueros seropositivos, con anticuerpos anti-RACH o anti-MuSK, en comparación con sueros control. Sin embargo, no observamos una reactividad significativa, pues sólo en algunas de las placas motoras más periféricas podíamos observar anticuerpos de los pacientes, no permitiéndonos una cuantificación adecuada.

Así mismo, cuando estudiamos 15 de los 18 sueros de pacientes con miastenia seronegativa (incluyendo los 14 que habían resultado positivos por inmunohistoquímica), no observamos reactividad contra las placas motoras **(Figura 19)**.



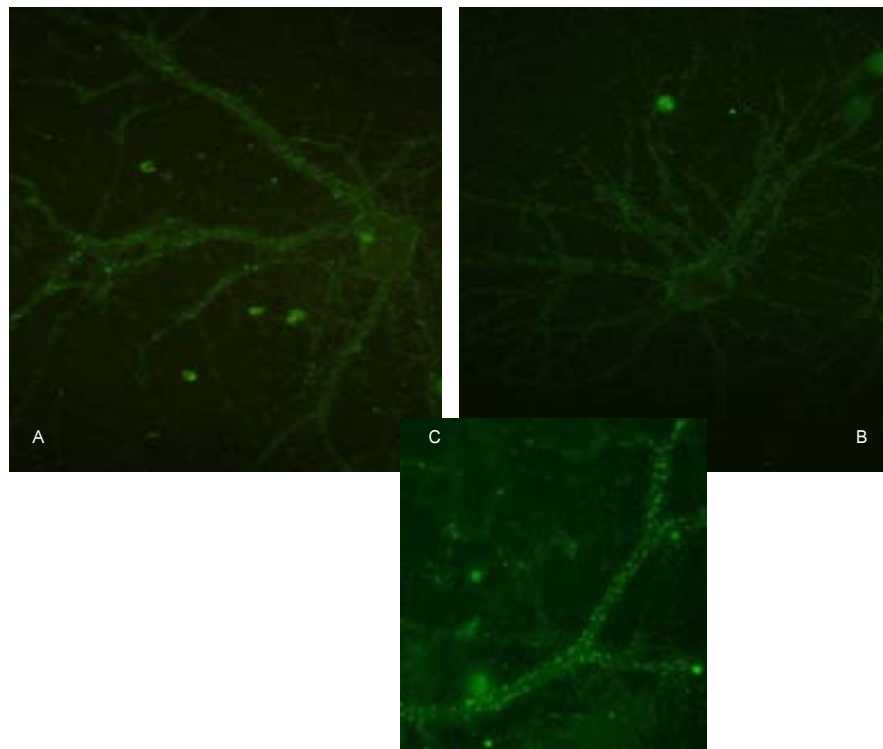
**Figura 19. Inmunofluorescencia sobre miotubos en cultivo.**

*Miotubos C2C12 tratados para la agrupación de RACH en placas motoras aneurales. La tinción de BTX que marca los RACH se muestra en la primera columna (A y D). La reactividad de un suero de miastenia RACH+ (B) y miastenia seronegativa (E) se muestra en la segunda columna. La fusión de las reactividades se muestra en la tercera columna, junto con los mionúcleos (C y F). Se observa una reactividad algo más marcada, lineal, en la superficie del miotubo a nivel de la placa motora superior en B, correspondiente a anticuerpos anti-RACH..*

### **3. El suero de algunos pacientes con miastenia seronegativa presenta inmunorreactividad contra antígenos de la superficie neuronal.**

Para detectar la posible reactividad de los sueros seronegativos contra antígenos pre-sinápticos de la UNM, tipo VGCC en los pacientes con LEMS, examinamos la capacidad de los anticuerpos de los pacientes para unirse a neuronas hipocampales no permeabilizadas.

Estudiamos 27 sueros de pacientes con miastenia seronegativa, de los cuales 7 (25.9%) mostraron inmunoreactividad contra antígenos de la superficie neuronal (Figura 20). El resto de sueros seronegativos, así como 4 sueros de controles sanos, no mostraron reactividad.



**Figura 20. Inmunofluorescencia sobre cultivo de neuronas.**

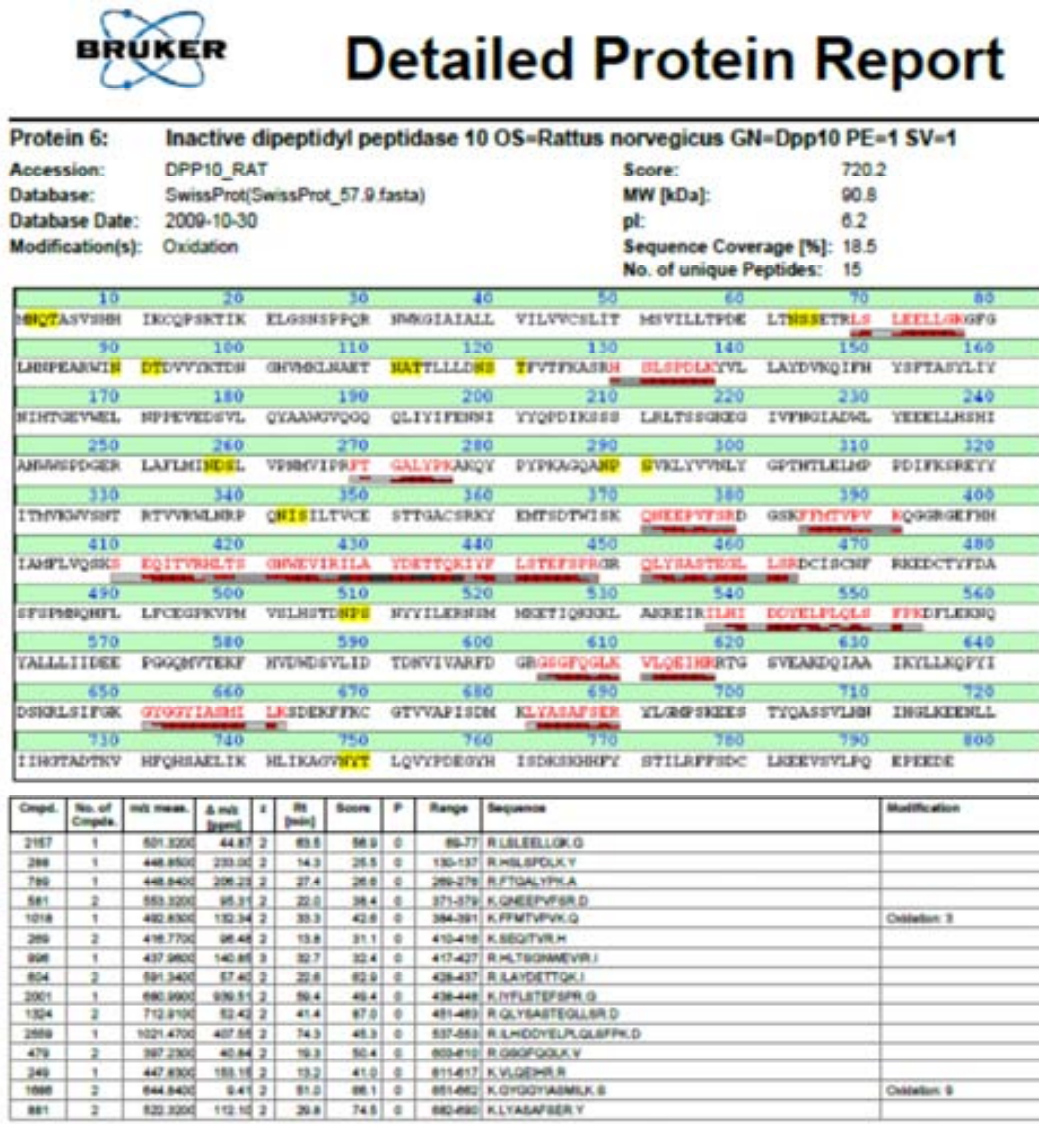
*Reactividad de sueros de miastenia seronegativa (A y B) sobre cultivos de neuronas hipocampales de rata, no permeabilizadas. Los anticuerpos de los pacientes se unen a la membrana neuronal, de forma similar a los anticuerpos de los pacientes de LEMS con anti-VGCC (detalle ampliado en C).*

#### **4. Identificamos Dipeptidil peptidasa 10 (DPPY) como autoantígeno en una paciente con miastenia seronegativa y timoma.**

Para tratar de identificar el antígeno diana en estos casos, escogimos un suero que presentaba una fuerte reactividad contra la membrana neuronal (a su vez era uno de los 14 seronegativos que reaccionaban contra la UNM por inmunohistoquímica) y realizamos inmunoprecipitación con cultivos de neuronas hipocampales. Posteriormente seleccionamos una banda del gel con un peso molecular algo inferior a 100 kDa y el análisis por espectrometría de masas mostró que era DPPY (**Figura 21**). Este suero correspondía a una paciente de 51 años con clínica de miastenia ocular (Clase I de la MGFA), sin otros antecedentes patológicos relevantes, que fue intervenida en 2007 de un timoma invasivo con histología de predominio linfocítico. Un año más tarde fue operada de nuevo por implantes diafragmáticos y pleurales. Los síntomas miasténicos se controlan con tratamiento sintomático con piridostigmina y no ha requerido el uso de inmunomoduladores o inmunosupresores.

DPPY es una proteína de membrana, dipeptidil peptidasa no funcional, que forma un complejo ternario con el canal de potasio Kv4.2 y las proteínas intracelulares KChIPs (Kv channel-interactin proteins)(140,141). A nivel del sistema nervioso se expresa en cerebro y ganglio raquídeo dorsal, pero también en otros órganos como riñón, ovario, testículo, páncreas y glándula adrenal.

Figura 21.



El canal Kv4.2, constituido por subunidades que forman un poro, media la mayoría de las corrientes de potasio tipo A subumbrales de las neuronas. Estas corrientes iónicas son cruciales para la regulación de la frecuencia de descarga de las neuronas, la propagación retrógrada del potencial de acción en las dendritas, la integración dendrítica y la plasticidad sináptica. Se han implicado en varias



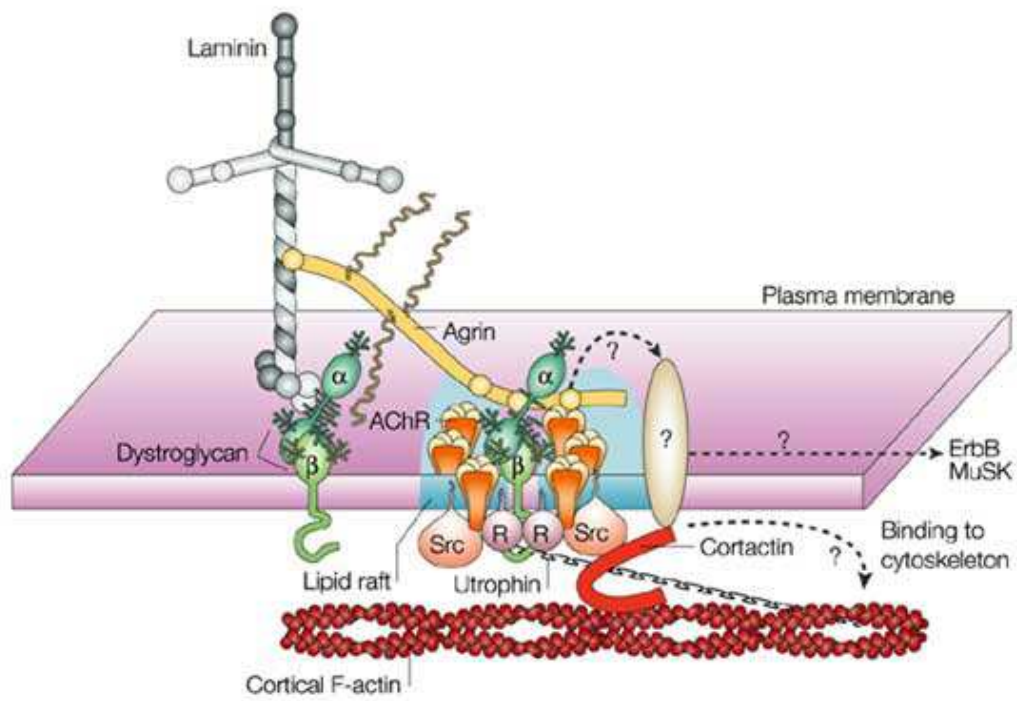
enfermedades, desde dolor a epilepsia o trastornos del espectro autista(142). Sin embargo se desconoce su expresión a nivel de la UNM y no existen descripciones de que pueda jugar un papel en la transmisión sináptica a este nivel.

Otros 3 sueros de pacientes seronegativos con reactividad contra antígenos de la superficie neuronal fueron también utilizados para inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masas, sin conseguir hallar proteínas relevantes.

#### **5. Un subgrupo de pacientes con miastenia, seronegativa o seropositiva, tienen anticuerpos contra Cortactin.**

Los resultados que obtuvimos en el array de proteínas humanas señalaban Cortactin como un posible autoantígeno candidato por mostrar interacción significativa con los sueros de miastenia seronegativa que habíamos incubado en el array. Cortactin fue la cuarta proteína con score más alto en el análisis normalizado de las señales, siendo de 201608 y el de la primera proteína de 281550. Escogimos Cortactin porque se encuentra concentrada en la UNM y actúa a continuación (downstream) de la cascada agrin/MuSK promoviendo la agrupación de los RACH (**Figura 22**). Tiene un papel esencial regulando la polimerización de los filamentos de actina y la agrupación de los RACH en respuesta a la estimulación sinaptogénica(143-145), por eso consideramos que podría ser una diana antigénica nueva e investigamos la presencia de anticuerpos contra Cortactin en pacientes con miastenia.

Figura 22.

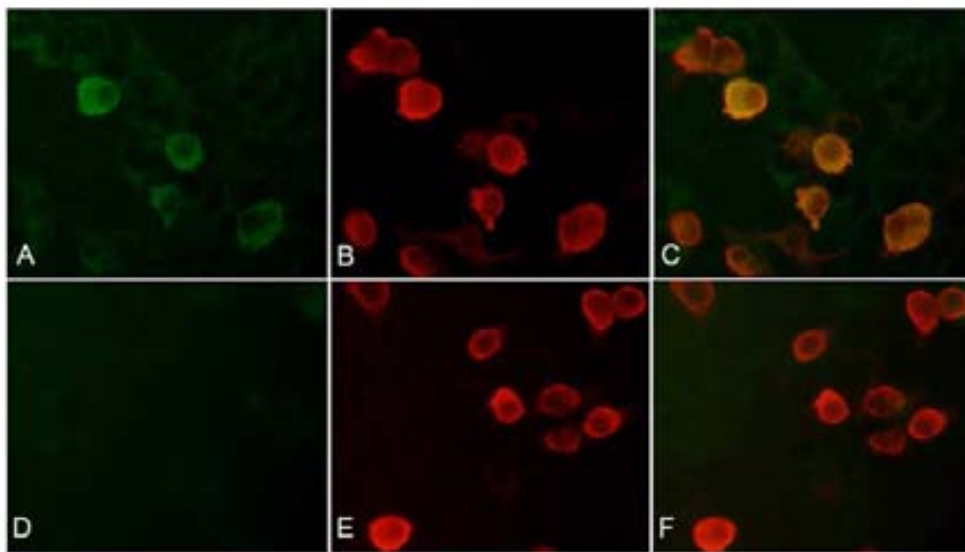


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Para este propósito comprobamos la reactividad de sueros de pacientes con miastenia, seronegativa y seropositiva, y sueros control mediante un ensayo celular usando células HEK transfectadas con Cortactin. De 93 sueros con miastenia seronegativa 15 (16%) fueron positivos en el ensayo celular (**Figura 23**), incluyendo dos casos que habían mostrado reactividad contra la UNM por inmunohistoquímica y que se habían incluido en el array de proteínas. De 104 sueros con miastenia seropositiva 12 (11.5%) fueron positivos en el ensayo celular, de ellos 9 tenían anticuerpos anti-RACH y 3 anti-MuSK. Estudiamos también el suero de 30 pacientes con LEMS (19 con anti-VGCC y 11 seronegativos),

resultando dos de ellos positivos (6.6%), ambos tenían anti-VGCC y uno de ellos un carcinoma de pulmón de célula pequeña. Ninguno de los 10 sueros de controles sanos mostró reactividad con las células transfectadas.

En conjunto, obtuvimos que el 13.6% de pacientes con miastenia tienen anticuerpos contra Cortactin. La proporción de casos positivos no difería entre miastenia seronegativa y seropositiva (16% vs 11.5%  $p= 0.4091$ ), ni tampoco existían diferencias en la proporción de anti-MuSK y anti-RACH positivos para Cortactin (12.7% vs 9%  $p= 0.7481$ ).

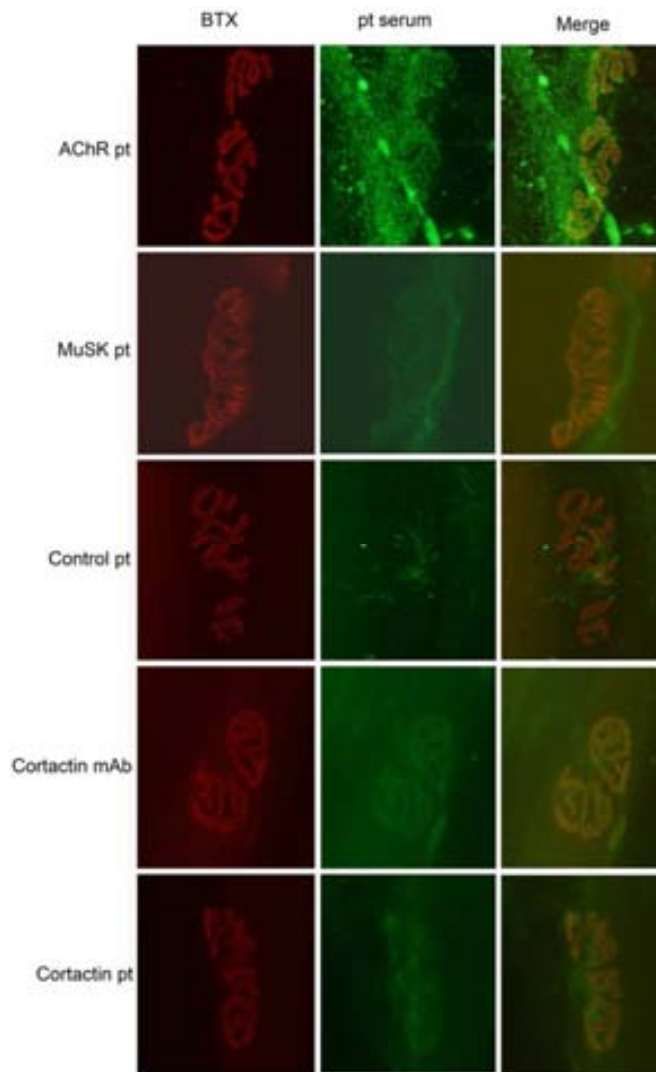


**Figura 23. Análisis de anticuerpos contra Cortactin mediante ensayo celular.**

*Células HEK que expresan Cortactin, inmunomarcadas con suero de paciente (A) o control (D) y un anticuerpo monoclonal contra Cortactin (B,E). La fusión de las reactividades se muestra en los paneles C y F. Se observa que los anticuerpos del paciente reaccionan con las células que expresan Cortactin.*

## **6. Los anticuerpos contra Cortactin muestran reactividad contra la UNM.**

Quisimos comprobar la capacidad de unión de los anticuerpos contra Cortactin con la UNM de ratón. Para ello aplicamos la misma técnica inmunohistoquímica que habíamos utilizado con los sueros sobre músculo de ratón, usando el anticuerpo comercial contra Cortactin a 1:1000 (Millipore). Observamos que las UNM presentaban reactividad con un patrón similar a BTX. Así mismo, dos de los sueros de pacientes con miastenia seronegativa y anticuerpos contra Cortactin mostraron también inmunorreactividad contra la UNM (**Figura 24**).



**Figura 24. Inmunorreactividad de anticuerpos contra Cortactin sobre la UNM.**

*Imágenes de microscopio de fluorescencia de UNM representativas (inmunohistoquímica de músculo de ratón). El anticuerpo comercial contra Cortactin muestra un patrón de reactividad sobre la UNM que colocaliza con la tinción de BTX. Así mismo, los anticuerpos de pacientes muestran reactividad contra la UNM. Los sueros RACH+, MuSK+ y controles sanos sirvieron como controles.*

## **7. Las características clínicas de los pacientes con miastenia y anticuerpos contra Cortactin son heterogéneas.**

A continuación estudiamos el fenotipo clínico de los 27 pacientes con miastenia y anticuerpos contra Cortactin, sin lograr encontrar características diferenciales ni poder definir un subgrupo realmente homogéneo (Tabla 7). La enfermedad era globalmente leve-moderada, estando el 70.4% de los pacientes en Clase I-III A de la MGFA. El 18.5% de los casos eran formas oculares, todos ellos del grupo de miastenia seronegativa. Tres pacientes tenían timoma, todos ellos provenían del grupo de miastenia seropositiva anti-RACH+. El 62.5% de los pacientes estudiados tenían otros autoanticuerpos, como antinucleares (7 pacientes), anti-tiroideos (3) o anti-músculo estriado (2). Entre ellos existían otras enfermedades autoinmunes concomitantes: 2 pacientes diabetes tipo I, 2 tiroiditis autoinmune y 2 glomerulonefritis. En el grupo de miastenia seronegativa había una mujer que presentó los síntomas de miastenia en el tercer trimestre del embarazo, y el bebé tuvo ptosis palpebral durante los primeros 10 días de vida.

El 85.2% de los pacientes requirieron tratamiento inmunosupresor, siendo prednisona, sola o en combinación con azatioprina el fármaco más frecuentemente utilizado (60.9% de los casos). La respuesta clínica al tratamiento fue completa en el 60.9% de los pacientes y sólo parcial en el 39.1% restante.

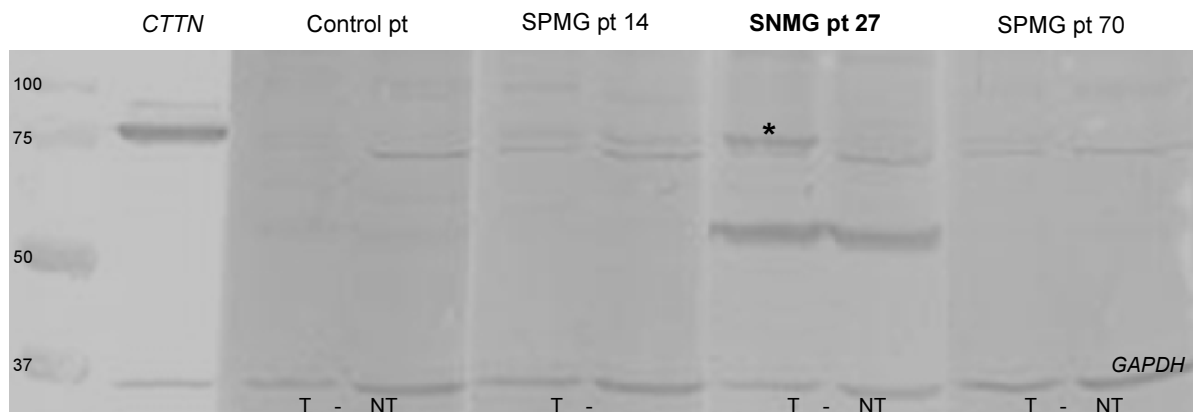
**Tabla 7.**

<b>Pacientes (n= 27)</b>			
Edad al inicio de los síntomas (mediana y rango)	34 años (5-66)		
Mujeres	16 (59.2%)		
Media de seguimiento (±DE)	8.8 años (±6.7)		
<b>Distribución de la debilidad</b>			
Ocular	5 (18.5%)		
Generalizada	22 (81.5%)		
<b>Clasificación de la MGFA</b>			
<b>I</b>	5 (18.5%)		
<b>II</b>	IIa	9 (33.3%)	6
	IIb		3
<b>III</b>	IIIa	8 (29.6%)	5
	IIIb		3
<b>IV</b>	IVa	4 (14.8)	1
	IVb		3
<b>V</b>	1 (3.7%)		
<b>Estudios</b>			
Estimulación repetitiva (decremento)	5 / 9 información disponible (55.5%)		
EMG fibra aislada (jitter anormal)	5 / 9 (55.5%)		
Otros autoanticuerpos	10 / 16 (62.5 %)		
<b>Tratamiento</b>			
Respuesta a anti-colinesterásicos	16/20 información disponible (80%)		
Timectomía	12 (44.4%)		
	9 hiperplasia	3 timoma	
Inmunosupresor	23 (85.2%)		
	PDN= 7 (30.4%)	PDN+AZA= 7 (30.4%)	
	Otros= 7 (30.4%)	RTX= 2 (8.7%)	
Respuesta	Completa= 14		Parcial= 9
	9 SNMG		2 SNMG
	5 SPMG		7 SPMG

Otros autoanticuerpos: ANA, anti- TPO/TGL y/o anti-músculo estriado  
 PDN: prednisona; AZA: azatioprina; Otros: ciclosporina, tacrolimus, micofenolato de mofetilo; RTX: rituximab

## 8. Los anticuerpos contra Cortactin están presentes en otras patologías autoinmunes.

Nos propusimos ampliar el estudio a un mayor número de controles (pacientes con otras enfermedades neurológicas, inmunomediadas o no, y pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas) para confirmar si la presencia de anticuerpos contra Cortactin era específica de miastenia, a pesar de no definir en principio un subgrupo de pacientes con características clínicas diferenciales. Para ello empleamos la técnica de inmunoblot, utilizando extracto de células transfectadas con Cortactin y en casos seleccionados comparando el resultado con células no transfectadas (**Figura 25**).



**Figura 25. Análisis de anticuerpos contra Cortactin por Inmunoblot.**

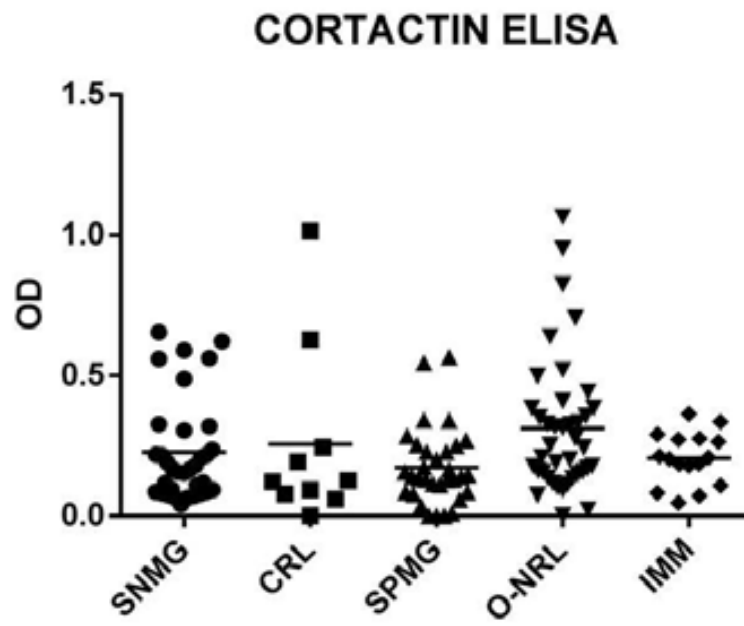
*Tiras alternas de HEK transfectadas con Cortactin (T) o no transfectadas (NT) incubadas con suero de paciente o de control. El anticuerpo comercial contra Cortactin muestra una banda de 80 kDa. En el paciente seronegativo n°27 se observa una banda con el mismo peso molecular (\*) que no está presente en la tira de NT. Los otros dos pacientes seronegativos y un control negativo no muestran esta banda específica. Un anticuerpo contra GAPDH sirve como control endógeno.*



En el subgrupo de miastenia seronegativa obtuvimos 14/93 casos positivos, parecido a los 15 del ensayo celular; sin embargo, entre las miastenias seropositivas sólo 7/104 casos fueron positivos, comparado con los 12 del ensayo celular. En el grupo control obtuvimos 7/117 casos positivos: 2 pacientes con CIDP, 2 con EM tipo remitente recidivante, 1 con síndrome de Sjögren, 1 con lupus y 1 con artritis reumatoide. En función de estos resultados, la proporción de casos positivos para Cortactin no difiere de forma significativa entre los pacientes con miastenia y el grupo control (10.6% vs 6%  $p= 0.2190$ ).

Por otro lado, buscando una técnica que pudiese aportar mayor sensibilidad, para no perder casos positivos dentro de las miastenias, aplicamos un ELISA utilizando Cortactin recombinante. Estudiamos una muestra representativa, compuesta por sueros de los diferentes subgrupos de pacientes y controles. Como resultado obtuvimos que la proporción de casos positivos no difería entre los grupos estudiados (**Figura 26**), 17/62 pacientes con miastenia y 16/66 controles (27.4% vs 24.24%  $p= 0.6918$ ). De las miastenias con anticuerpos contra Cortactin 9/32 eran seronegativas y 8/30 seropositivas. Entre los positivos del grupo control había 8/40 con otras enfermedades neurológicas (3 CIDP, 2 SGB, 2 EM y 1 NMO), 6/16 con enfermedades autoinmunes sistémicas (2 artritis reumatoide, 2 síndrome de Sjögren, 2 lupus) y 2/10 controles sanos.

Figura 26.



## **VI. DISCUSIÓN**

### **I. Respuesta al tratamiento inmunosupresor con Rituximab en pacientes con miastenia refractaria.**

En este estudio demostramos que Rituximab produce un beneficio clínico duradero en pacientes con miastenia grave y farmacorresistente. Todos los pacientes salvo uno mejoraron, alcanzaron un estado de MM o remisión. Sin embargo, el beneficio clínico fue más importante y duró más en el grupo con miastenia MuSK+. En cuanto a la respuesta inmune subyacente, destacó que los anticuerpos anti-MuSK descendieron de forma dramática durante el seguimiento a partir de un solo ciclo de Rituximab. Sin embargo, los anti-RACH permanecieron a los mismos títulos durante el mismo periodo de tiempo.

Nuestro trabajo no es el primero en sugerir la eficacia de Rituximab en pacientes con miastenia. En estudios previos un 96% (25/26) de pacientes con anticuerpos anti-MuSK y un 81% (30/37) de pacientes con anticuerpos anti-RACH presentaron una buena respuesta clínica tras una media de seguimiento de 19 meses(101,146). Pero nuestro estudio es el primero en demostrar la eficacia del tratamiento tras un período largo de seguimiento y en comparar los resultados entre miastenia RACH+ y MuSK+. Demostramos que la respuesta, tanto clínica como inmunológica, fue mejor y más

persistente en el grupo con miastenia MuSK+. Por otro lado, entre los pacientes con miastenia RCh+, un 54% presentaron recaídas que precisaron reinfusiones y el tratamiento inmunosupresor concomitante no se pudo reducir.

Las diferencias observadas en la respuesta al tratamiento se podrían explicar por las divergencias en la patogénesis de la miastenia RCh+ y MuSK+. Primero, las subclases de anticuerpos principales en la miastenia RCh+ son IgG1 e IgG3, mientras que en la miastenia MuSK+ es IgG4. Segundo, las células T helper (Th) han sido implicadas en la patogenia de los dos subtipos, pero mientras la respuesta Th1 está relacionada con la producción de IgG1 e IgG3, las Th2 están relacionadas con la generación de anticuerpos IgG4. Y por último, las alteraciones en la histología del timo y la presencia de anticuerpos anti-músculo estriado son frecuentes en la miastenia RCh+ pero muy raros en la miastenia MuSK+.

Los mecanismos que generan la respuesta inmune IgG4 no son bien conocidos. Otros autores han descrito una respuesta similar, rápida y duradera, a una única dosis de Rituximab en otras enfermedades asociadas a IgG4, como el pénfigo(147). Hemos observado que Rituximab no afecta las células plasmáticas de larga duración, basándonos en el rápido descenso post-tratamiento de los títulos de anticuerpos anti-MuSK. Por tanto, podemos lanzar la hipótesis de que estos anticuerpos IgG4 podrían ser producidos esencialmente por células plasmáticas de corta duración. A favor de ello, los niveles de IgM de nuestros pacientes, que son generadas por células

plasmáticas de corta duración, descendieron después del tratamiento, mientras que los niveles de IgG contra AChR, producidas por células plasmáticas de larga duración, permanecieron estables. Además, el cambio en el isotipo principal anti-MuSK de IgG4 a IgG1 después del tratamiento, que previamente se había sugerido que influía en las fluctuaciones clínicas(104), se observó también en 3 de los pacientes con miastenia MuSK+. En este sentido, recientemente se ha descrito que las IgG4 son casi exclusivamente sintetizadas por células B reguladoras, productoras de IL-10. Los estudios funcionales muestran que estas células B aumentan significativamente IgG4 y no IgG1, IgA o IgE al diferenciar a células plasmáticas(148). De alguna manera, el tratamiento con Rituximab podría dirigirse preferiblemente contra estas células y por eso observaríamos el descenso importante en los anticuerpos IgG4 anti-MuSK y no en los IgG1 anti-AChR.

Rituximab tiene un perfil de efectos adversos favorable, pero a pesar de todo se han reportado casos ocasionales de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) en pacientes con enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, con una frecuencia estimada de 1/25000 casos tratados. Hasta ahora, no se han reportado casos de pacientes con miastenia tratados con Rituximab que desarrollen LMP, pero se recomienda un seguimiento estrecho.

Hemos observado una respuesta excelente al tratamiento con Rituximab en pacientes con miastenia MuSK+ refractaria, previniéndose las recaídas y conteniéndose la

respuesta inmune a largo plazo. Por lo tanto, si se confirma la buena tolerancia y el perfil riesgo-beneficio favorable, el siguiente paso sería realizar un ensayo clínico prospectivo, enmascarado, aleatorizado y controlado para explorar el uso de Rituximab como tratamiento de primera línea en estos pacientes.

## **II. Búsqueda de nuevos autoanticuerpos en miastenia seronegativa.**

### **1. Anticuerpos contra Cortactin.**

En este estudio reportamos por primera vez la presencia de anticuerpos contra Cortactin en pacientes con miastenia, lo que nos hizo pensar que podrían utilizarse como un nuevo biomarcador. Primero determinamos la reactividad del suero de un grupo de pacientes con miastenia seronegativa contra la UNM de ratón y encontramos que el 78% de ellos tenían inmunorreactividad, lo que indica la presencia de anticuerpos contra componentes de la UNM. Después, seleccionamos algunos de los sueros con mayor reactividad y utilizamos un array de proteínas humanas gracias al cual identificamos Cortactin como autoantígeno candidato. Mediante inmunohistoquímica de músculo de ratón observamos que Cortactin está presente en la UNM, de forma similar a las IgG de los pacientes, superponiéndose a la tinción de BTX, como muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal contra Cortactin. A continuación analizamos la presencia de anticuerpos contra Cortactin mediante ensayo celular y encontramos que

27/198 pacientes con miastenia eran positivos, sumando los seronegativos y seropositivos, sugiriendo que podría ser un nuevo antígeno diana.

Desconocemos la posible contribución de estos anticuerpos en la fisiopatología de la miastenia. Cortactin ha sido asociada con los procesos de desarrollo de la UNM y es necesaria para la formación de las agrupaciones de RACH. Es una proteína que interviene en el ensamblaje local de las especializaciones del citoesqueleto, en respuesta a señales sinaptogénicas provenientes de nervio y músculo(145). Cortactin señala mediante fosforilación a continuación del eje agrin/MuSK y promueve la polimerización de actina y la agrupación de RACH/rapsin. Estudios in vitro han demostrado que el tratamiento de miotubos con agrin aumenta de forma significativa la fosforilación de tirosina de Cortactin y que al introducir una Cortactin mutante (incapaz de fosforilar) en las células musculares se inhibe de forma potente la agregación de los RACH sinápticos en respuesta a la inervación(144). El hecho de que hayamos encontrado anticuerpos contra Cortactin no sólo en pacientes con miastenia seronegativa sino también en pacientes con anticuerpos contra RACH o MuSK podría indicar que su presencia es secundaria al proceso de la enfermedad, consecuencia del daño estructural de la UNM.

Estudios previos han identificado autoanticuerpos contra otros antígenos intracelulares concentrados en la UNM. Por ejemplo, los anticuerpos anti-músculo estriado, que reaccionan contra epítomos de proteínas musculares como titina o

receptor de rianodina, se detectan frecuentemente en pacientes con miastenia de inicio tardío y con timoma, y su presencia se asociado con una mayor gravedad de la enfermedad(116,117). Sin embargo, estos anticuerpos no se hallan en pacientes sin anti-RACH y tampoco existe evidencia de que puedan inducir cambios estructurales en el músculo esquelético.

En nuestro estudio, no hemos encontrado un fenotipo clínico común entre los pacientes con miastenia y anticuerpos contra Cortactin, y su presencia no parece correlacionarse con la gravedad de la enfermedad. En todo caso, su utilidad estaría limitada a los casos de miastenia seronegativa, en los cuales no disponemos de otro marcador específico que nos puede orientar a que existe un proceso inmunopatológico subyacente. Según nuestros datos, el 16% de pacientes con miastenia seronegativa tienen anticuerpos contra Cortactin, pero el resto de los pacientes continúan siendo negativos, lo que indica que deben existir otros antígenos desconocidos en este subgrupo ya que hasta un 78% tenían inmunoreactividad contra la UNM de ratón.

Por otro lado, hemos encontrado anticuerpos contra Cortactin en 2/30 pacientes con LEMS, indicando que también pueden estar presentes en trastornos presinápticos de la UNM. La coexistencia de varios autoanticuerpos en pacientes con miastenia sugiere la presencia de varios antígenos diana, incluyendo diversas proteínas de la UNM. De forma similar, los anticuerpos anti-LRP4 han sido encontrados en pacientes con anti-MuSK en dos cohortes diferentes, y también en



un paciente con LEMS(127,129). Anteriormente, nuestro grupo reportó el caso de una paciente en la que coexistían también múltiples anticuerpos, contra RACH, MuSK y Caspr2 (contactin associated protein 2) y que tenía un cuadro clínico de miastenia y síndrome de Morvan, afectando simultáneamente sistema nervioso periférico y central(133). Este fenómeno podría ser el resultado de una extensión del epítipo (epitope spreading) que amplía el ataque inmunológico y aumenta el daño al antígeno diana. También los anticuerpos contra LRP4 se han hallado en 2 pacientes con NMO, y la asociación de miastenia y NMO ya es conocida (149).

Sin embargo, el hecho de haber encontrado anticuerpos contra Cortactin por técnicas diferentes (inmunoblot o ELISA) en pacientes con otras enfermedades autoinmunes (neurológicas o sistémicas, agudas o crónicas), como CIDP, SGB, EM, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide o lupus, va en contra de que pueda ser usado como un biomarcador específico de miastenia. En vista de estos resultados volvimos a aplicar la técnica de ensayo celular en una selección de pacientes con miastenia pero no pudimos replicar los resultados obtenidos inicialmente en todos ellos. Una serie de sueros que previamente habíamos considerado como positivos no eran reactivos al repetir el estudio. A continuación decidimos repetir el ensayo celular de la misma selección de sueros en manos de un técnico que desconocía los resultados previos y evaluarlo de forma ciega por otro investigador con amplia experiencia en este tipo de estudios. Desafortunadamente no obtuvimos resultados concordantes con los anteriores y por lo tanto no confiamos en la fiabilidad de este método para estudiar toda la serie de controles con otras

enfermedades neurológicas o autoinmunes. Finalmente, hemos tratado de poner a punto la técnica de inmunocitoquímica variando diferentes condiciones de fijación, de incubación y las concentraciones de anticuerpos, sin llegar a obtener un ensayo consistente.

Por ahora, los resultados obtenidos con las técnicas aplicadas no nos permiten otorgar relevancia fisiopatológica al hallazgo de estos nuevos autoanticuerpos en pacientes con miastenia. Podría tratarse como un indicador de autoinmunidad, inespecífico, como lo son los anticuerpos anti-nucleares.

Uno de los puntos fuertes de nuestro estudio es la inclusión de gran número de pacientes y de controles y otro, el empleo de varias técnicas para primero detectar la presencia de anticuerpos, luego identificar potenciales dianas antigénicas y finalmente confirmar los posibles hallazgos relevantes. Las limitaciones son varias y en cierta manera pueden venir también derivadas de esos mismos puntos, pues cada técnica tiene una sensibilidad y especificidad diferente y no siempre son comparables. Por inmunoblot los anticuerpos detectan epítomos lineales mientras que en el ensayo celular la proteína se presenta de manera conformacional. En el ELISA utilizamos proteína recombinante mientras que en inmunocitoquímica e inmunoblot utilizamos células HEK transfectadas con Cortactin.

En el caso por ejemplo de los anti-LRP4, como hemos apuntado en la introducción, se considera que las diferencias en el porcentaje de pacientes positivos

encontrados son debidas a los métodos utilizados, la fuente de proteína, el estado conformacional del antígeno y las diferencias entre las poblaciones estudiadas(150). Podríamos decir que en el caso de los anticuerpos contra Cortactin ocurre algo parecido, estudiando grupos diferentes (miastenia, enfermedades neurológicas inmunomediadas, enfermedades autoinmunes sistémicas) mediante varias técnicas se obtienen resultados variables. El encontrar resultados positivos incluso dentro de los controles sanos puede significar que el ELISA es una técnica demasiado sensible. La falta de consistencia en el ensayo celular podría deberse a que la capacidad de los anticuerpos para reconocer el antígeno es altamente dependiente de la conformación del mismo, y varía de forma significativa en función de las condiciones a las que son sometidas las células (confluencia, fijación...); teniendo en cuenta además que Cortactin es una proteína dinámica que interviene en procesos de adhesión celular, migración y endocitosis. Serían necesarios estudios funcionales para explorar el posible papel de estos anticuerpos a nivel molecular, celular e incluso animal (pej. tratar de establecer un modelo por inmunización activa o pasiva).

No obstante, aunque los anticuerpos contra Cortactin no sean específicos de miastenia, su determinación podría tener utilidad en el grupo de miastenia seronegativa, como indicador de autoinmunidad. En pacientes en los que no se detectan anticuerpos contra los antígenos de la UNM conocidos, el diagnóstico de miastenia supone a veces un reto, pues pueden presentar síntomas leves, negatividad de otras pruebas complementarias y respuesta al tratamiento difícil

de valorar objetivamente. En estos casos, la positividad de los anticuerpos contra Cortactin nos ayudaría a pensar que estamos delante de una miastenia autoinmune, evitaría la realización de pruebas diagnósticas más agresivas, como una biopsia muscular, y contribuiría al manejo terapéutico, otorgándole un significado clínico.

## **2. Anticuerpos contra DPPY.**

En este estudio reportamos por primera vez la presencia de anticuerpos contra DPPY en una paciente con miastenia seronegativa y timoma. Su validación mediante la detección de los anticuerpos por otro método, así como el estudio del resto de los pacientes seronegativos está pendiente en el momento actual. DPPY, al igual que DPPX (51% de homología, diferente distribución en el cerebro), son proteínas auxiliares del complejo del canal de potasio Kv4.2 que actúan modulando su expresión en la superficie de las dendritas y modificando sus propiedades funcionales(141). Este tipo de canal de potasio pertenece a la familia de canales Shal (Kv4), que tiene propiedades diferentes comparadas con la Shaker (Kv1)(151), anteriormente considerada como diana de los anticuerpos asociados a encefalitis límbica, neuromiotonía y síndrome de Morvan (los principales autoantígenos son LGI1 y Caspr2)(152,153).

DPPX, la otra subunidad de la superficie celular, reguladora del Kv4.2, ha sido identificado recientemente como autoantígeno en pacientes con encefalitis

caracterizada por hiperactividad del sistema nervioso central, con agitación, mioclonias, temblor y crisis epilépticas. Estos pacientes tenían pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo, frecuentemente diarrea al inicio del cuadro clínico y respondían al tratamiento con inmunoterapia(154). Por otro lado, la presencia de timoma se asocia a otras encefalitis con anticuerpos contra proteínas sinápticas y de la superficie neuronal, como el receptor de AMPA, LGI1 y Caspr2(155). Sin embargo, nuestra paciente con anticuerpos contra DPPY tenía síntomas de miastenia ocular al inicio de la enfermedad y fue intervenida en varias ocasiones de un timoma agresivo, pero no requirió tratamiento inmunosupresor ni tampoco presentó clínica de hiperactividad del sistema nervioso central en ningún momento. Este hallazgo, de cuadros clínicos tan diferentes pero con un sustrato inmunológico dirigido contra dianas tan próximas antigénicamente, merece ser estudiado con más profundidad.

También cabe destacar la presencia de anticuerpos contra antígenos de superficie neuronal en otros 6 pacientes con miastenia seronegativa, que por el momento están sin identificar.



## VII. CONCLUSIONES

1. De la Primera hipótesis: *Rituximab es una terapia eficaz para el tratamiento de los pacientes con miastenia refractaria a los tratamientos inmunosupresores convencionales.*

- Rituximab mejora el estado clínico e inmunológico de los pacientes con miastenia refractaria a otros tratamientos inmunosupresores.
- La mejoría es acentuada y persiste en el tiempo sobre todo en los pacientes con miastenia MuSK+.
- En vista del beneficio observado a largo plazo, recomendamos el uso de Rituximab como opción terapéutica precoz en los pacientes con miastenia MuSK+, si no responden a prednisona. En cambio, en pacientes con miastenia RACH+ reservaríamos esta opción terapéutica para después de los tratamientos inmunosupresores de segunda línea.

2. De la segunda hipótesis: *Los pacientes con miastenia seronegativa son un grupo heterogéneo desde el punto de vista clínico e inmunológico. En su patogenia intervienen anticuerpos frente a diversos antígenos de la UNM no conocidos.*

- Identificamos Cortactin, una proteína que promueve el agrupamiento de los RACH, como antígeno nuevo utilizando un array de proteínas humanas.
- Un subgrupo de pacientes con miastenia seronegativa tiene anticuerpos contra Cortactin detectados mediante ensayo celular, lo que podría tener implicaciones en el diagnóstico y el tratamiento.
- La presencia de anticuerpos contra Cortactin no es específica de miastenia, pues pueden detectarse utilizando inmunoblot o ELISA en otras enfermedades inmunomediadas, neurológicas o sistémicas.
- Identificamos DPPY, una subunidad reguladora del canal de potasio Kv4.2, como antígeno nuevo utilizando una técnica novedosa, cultivos de neuronas.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1994 Jun 23;330(25):1797-1810.
- (2) Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 1973 May 25;180(4088):871-872.
- (3) Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001 Mar;7(3):365-368.
- (4) Berrih S, Morel E, Gaud C, Raimond F, Le Brigand H, Bach JF. Anti-AChR antibodies, thymic histology, and T cell subsets in myasthenia gravis. *Neurology* 1984 Jan;34(1):66-71.
- (5) Roxanis I, Micklem K, Willcox N. True epithelial hyperplasia in the thymus of early-onset myasthenia gravis patients: implications for immunopathogenesis. *J Neuroimmunol* 2001 Jan 1;112(1-2):163-173.
- (6) Giraud M, Vandiedonck C, Garchon HJ. Genetic factors in autoimmune myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:180-192.
- (7) Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol* 2009 May;8(5):475-490.
- (8) Newsom-Davis J. Therapy in myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Semin Neurol* 2003 Jun;23(2):191-198.
- (9) Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO, McConville J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol* 2010 Jun 18;10:46-2377-10-46.
- (10) Aragones JM, Bolibar I, Bonfill X, Bufill E, Mummany A, Alonso F, et al. Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology* 2003 Mar 25;60(6):1024-1026.
- (11) Grob D, Brunner N, Namba T, Pagala M. Lifetime course of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2008 Feb;37(2):141-149.
- (12) Zhang X, Yang M, Xu J, Zhang M, Lang B, Wang W, et al. Clinical and serological study of myasthenia gravis in HuBei Province, China. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007 Apr;78(4):386-390.

- (13) Rodolico C, Toscano A, Autunno M, Messina S, Nicolosi C, Aguenouz M, et al. Limb-girdle myasthenia: clinical, electrophysiological and morphological features in familial and autoimmune cases. *Neuromuscul Disord* 2002 Dec;12(10):964-969.
- (14) Nations SP, Wolfe GI, Amato AA, Jackson CE, Bryan WW, Barohn RJ. Distal myasthenia gravis. *Neurology* 1999 Feb;52(3):632-634.
- (15) Compston DA, Vincent A, Newsom-Davis J, Batchelor JR. Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain* 1980 Sep;103(3):579-601.
- (16) Christensen PB, Jensen TS, Tsiropoulos I, Sorensen T, Kjaer M, Hojer-Pedersen E, et al. Associated autoimmune diseases in myasthenia gravis. A population-based study. *Acta Neurol Scand* 1995 Mar;91(3):192-195.
- (17) Aarli JA. Late-onset myasthenia gravis: a changing scene. *Arch Neurol* 1999 Jan;56(1):25-27.
- (18) Romi F, Skeie GO, Gilhus NE, Aarli JA. Striational antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance. *Arch Neurol* 2005 Mar;62(3):442-446.
- (19) Evoli A, Minisci C, Di Schino C, Marsili F, Punzi C, Batocchi AP, et al. Thymoma in patients with MG: characteristics and long-term outcome. *Neurology* 2002 Dec 24;59(12):1844-1850.
- (20) 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 Oct;126(Pt 10):2304-2311.
- (21) Hatanaka Y, Hemmi S, Morgan MB, Scheufele ML, Claussen GC, Wolfe GI, et al. Nonresponsiveness to anticholinesterase agents in patients with MuSK-antibody-positive MG. *Neurology* 2005 Nov 8;65(9):1508-1509.
- (22) Gupthill JT, Sanders DB, Evoli A. Anti-MuSK antibody myasthenia gravis: clinical findings and response to treatment in two large cohorts. *Muscle Nerve* 2011 Jul;44(1):36-40.
- (23) Leite MI, Strobel P, Jones M, Micklem K, Moritz R, Gold R, et al. Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG. *Ann Neurol* 2005 Mar;57(3):444-448.
- (24) Kupersmith MJ, Latkany R, Homel P. Development of generalized disease at 2 years in patients with ocular myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2003 Feb;60(2):243-248.

- (25) Chen WH, Chiu HC, Hseih RP. Association of HLA-Bw46DR9 combination with juvenile myasthenia gravis in Chinese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993 Apr;56(4):382-385.
- (26) Maniaol AH, Elsaïs A, Lorentzen AR, Owe JF, Viken MK, Saether H, et al. Late onset myasthenia gravis is associated with HLA DRB1\*15:01 in the Norwegian population. *PLoS One* 2012;7(5):e36603.
- (27) Matsuki K, Juji T, Tokunaga K, Takamizawa M, Maeda H, Soda M, et al. HLA antigens in Japanese patients with myasthenia gravis. *J Clin Invest* 1990 Aug;86(2):392-399.
- (28) Amdahl C, Alseth EH, Gilhus NE, Nakkestad HL, Skeie GO. Polygenic disease associations in thymomatous myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2007 Dec;64(12):1729-1733.
- (29) Niks EH, Kuks JB, Roep BO, Haasnoot GW, Verduijn W, Ballieux BE, et al. Strong association of MuSK antibody-positive myasthenia gravis and HLA-DR14-DQ5. *Neurology* 2006 Jun 13;66(11):1772-1774.
- (30) Provenzano C, Ricciardi R, Scuderi F, Maiuri MT, Maestri M, La Carpia F, et al. PTPN22 and myasthenia gravis: replication in an Italian population and meta-analysis of literature data. *Neuromuscul Disord* 2012 Feb;22(2):131-138.
- (31) van der Pol WL, Jansen MD, Kuks JB, de Baets M, Leppers-van de Straat FG, Wokke JH, et al. Association of the Fc gamma receptor IIA-R/R131 genotype with myasthenia gravis in Dutch patients. *J Neuroimmunol* 2003 Nov;144(1-2):143-147.
- (32) Garchon HJ, Djabiri F, Viard JP, Gajdos P, Bach JF. Involvement of human muscle acetylcholine receptor alpha-subunit gene (CHRNA) in susceptibility to myasthenia gravis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 May 24;91(11):4668-4672.
- (33) Gregersen PK, Kosoy R, Lee AT, Lamb J, Sussman J, McKee D, et al. Risk for myasthenia gravis maps to a (151) Pro-->Ala change in TNIP1 and to human leukocyte antigen-B\*08. *Ann Neurol* 2012 Dec;72(6):927-935.
- (34) Pascuzzi RM. The edrophonium test. *Semin Neurol* 2003 Mar;23(1):83-88.
- (35) Golnik KC, Pena R, Lee AG, Eggenberger ER. An ice test for the diagnosis of myasthenia gravis. *Ophthalmology* 1999 Jul;106(7):1282-1286.
- (36) Sanders DB, Howard JF, Jr, Johns TR. Single-fiber electromyography in myasthenia gravis. *Neurology* 1979 Jan;29(1):68-76.

- (37) Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology* 1976 Nov;26(11):1054-1059.
- (38) Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985 Dec;48(12):1246-1252.
- (39) Tindall RS. Humoral immunity in myasthenia gravis: biochemical characterization of acquired antireceptor antibodies and clinical correlations. *Ann Neurol* 1981 Nov;10(5):437-447.
- (40) Howard FM, Jr, Lennon VA, Finley J, Matsumoto J, Elveback LR. Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1987;505:526-538.
- (41) 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 Apr;55(4):580-584.
- (42) Buckley C, Newsom-Davis J, Willcox N, Vincent A. Do titin and cytokine antibodies in MG patients predict thymoma or thymoma recurrence? *Neurology* 2001 Nov 13;57(9):1579-1582.
- (43) Gronseth GS, Barohn RJ. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2000 Jul 12;55(1):7-15.
- (44) Batocchi AP, Evoli A, Di Schino C, Tonali P. Therapeutic apheresis in myasthenia gravis. *Ther Apher* 2000 Aug;4(4):275-279.
- (45) Gajdos P, Tranchant C, Clair B, Bolgert F, Eymard B, Stojkovic T, et al. Treatment of myasthenia gravis exacerbation with intravenous immunoglobulin: a randomized double-blind clinical trial. *Arch Neurol* 2005 Nov;62(11):1689-1693.
- (46) Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 2001 Jan 19;291(5503):484-486.
- (47) Brannagan TH, 3rd, Nagle KJ, Lange DJ, Rowland LP. Complications of intravenous immune globulin treatment in neurologic disease. *Neurology* 1996 Sep;47(3):674-677.

- (48) Pascuzzi RM, Coslett HB, Johns TR. Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients. *Ann Neurol* 1984 Mar;15(3):291-298.
- (49) Sghirlanzoni A, Peluchetti D, Mantegazza R, Fiacchino F, Cornelio F. Myasthenia gravis: prolonged treatment with steroids. *Neurology* 1984 Feb;34(2):170-174.
- (50) Cosi V, Citterio A, Lombardi M, Piccolo G, Romani A, Erbetta A. Effectiveness of steroid treatment in myasthenia gravis: a retrospective study. *Acta Neurol Scand* 1991 Jul;84(1):33-39.
- (51) Evoli A, Batocchi AP, Palmisani MT, Lo Monaco M, Tonali P. Long-term results of corticosteroid therapy in patients with myasthenia gravis. *Eur Neurol* 1992;32(1):37-43.
- (52) Bhanushali MJ, Wu J, Benatar M. Treatment of ocular symptoms in myasthenia gravis. *Neurology* 2008 Oct 21;71(17):1335-1341.
- (53) Frauman AG. An overview of the adverse reactions to adrenal corticosteroids. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 1996 Nov;15(4):203-206.
- (54) Witte AS, Cornblath DR, Parry GJ, Lisak RP, Schatz NJ. Azathioprine in the treatment of myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1984 Jun;15(6):602-605.
- (55) Mantegazza R, Antozzi C, Peluchetti D, Sghirlanzoni A, Cornelio F. Azathioprine as a single drug or in combination with steroids in the treatment of myasthenia gravis. *J Neurol* 1988 Nov;235(8):449-453.
- (56) Palace J, Newsom-Davis J, Lecky B. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Study Group. *Neurology* 1998 Jun;50(6):1778-1783.
- (57) Kissel JT, Levy RJ, Mendell JR, Griggs RC. Azathioprine toxicity in neuromuscular disease. *Neurology* 1986 Jan;36(1):35-39.
- (58) Chaudhry V, Cornblath DR, Griffin JW, O'Brien R, Drachman DB. Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular diseases. *Neurology* 2001 Jan 9;56(1):94-96.
- (59) Meriggioli MN, Ciafaloni E, Al-Hayk KA, Rowin J, Tucker-Lipscomb B, Massey JM, et al. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis: an analysis of efficacy, safety, and tolerability. *Neurology* 2003 Nov 25;61(10):1438-1440.
- (60) Muscle Study Group. A trial of mycophenolate mofetil with prednisone as initial immunotherapy in myasthenia gravis. *Neurology* 2008 Aug 5;71(6):394-399.

- (61) Sanders DB, Hart IK, Mantegazza R, Shukla SS, Siddiqi ZA, De Baets MH, et al. An international, phase III, randomized trial of mycophenolate mofetil in myasthenia gravis. *Neurology* 2008 Aug 5;71(6):400-406.
- (62) Tindall RS, Phillips JT, Rollins JA, Wells L, Hall K. A clinical therapeutic trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1993 Jun 21;681:539-551.
- (63) Ciafaloni E, Nikhar NK, Massey JM, Sanders DB. Retrospective analysis of the use of cyclosporine in myasthenia gravis. *Neurology* 2000 Aug 8;55(3):448-450.
- (64) Ponseti JM, Gamez J, Azem J, Lopez-Cano M, Vilallonga R, Armengol M. Tacrolimus for myasthenia gravis: a clinical study of 212 patients. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:254-263.
- (65) Nagane Y, Utsugisawa K, Obara D, Kondoh R, Terayama Y. Efficacy of low-dose FK506 in the treatment of Myasthenia gravis--a randomized pilot study. *Eur Neurol* 2005;53(3):146-150.
- (66) Takamori M, Motomura M, Kawaguchi N, Nemoto Y, Hattori T, Yoshikawa H, et al. Anti-ryanodine receptor antibodies and FK506 in myasthenia gravis. *Neurology* 2004 May 25;62(10):1894-1896.
- (67) De Feo LG, Schottlender J, Martelli NA, Molfino NA. Use of intravenous pulsed cyclophosphamide in severe, generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2002 Jul;26(1):31-36.
- (68) Drachman DB, Adams RN, Hu R, Jones RJ, Brodsky RA. Rebooting the immune system with high-dose cyclophosphamide for treatment of refractory myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:305-314.
- (69) Pescovitz MD. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* 2006 May;6(5 Pt 1):859-866.
- (70) Diaz-Manera J, Rojas Garcia R, Illa I. Treatment strategies for myasthenia gravis: an update. *Expert Opin Pharmacother* 2012 Sep;13(13):1873-1883.
- (71) Jaretzki A, 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keesey JC, Penn AS, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology* 2000 Jul 12;55(1):16-23.
- (72) Sanes JR, Lichtman JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2001 Nov;2(11):791-805.

- (73) Gomez AM, Van Den Broeck J, Vrolix K, Janssen SP, Lemmens MA, Van Der Esch E, et al. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis-pathogenesis at the neuromuscular junction. *Autoimmunity* 2010 Aug;43(5-6):353-370.
- (74) Toyka KV, Drachman DB, Griffin DE, Pestronk A, Winkelstein JA, Fishbeck KH, et al. Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med* 1977 Jan 20;296(3):125-131.
- (75) Lennon VA, Lambert EH. Myasthenia gravis induced by monoclonal antibodies to acetylcholine receptors. *Nature* 1980 May 22;285(5762):238-240.
- (76) Newsom-Davis J, Pinching AJ, Vincent A, Wilson SG. Function of circulating antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: investigation by plasma exchange. *Neurology* 1978 Mar;28(3):266-272.
- (77) 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 Apr;50(4):1045-1054.
- (78) Aissaoui A, Klingel-Schmitt I, Couderc J, Chateau D, Romagne F, Jambou F, et al. Prevention of autoimmune attack by targeting specific T-cell receptors in a severe combined immunodeficiency mouse model of myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1999 Oct;46(4):559-567.
- (79) Sahashi K, Engel AG, Linstrom JM, Lambert EH, Lennon VA. Ultrastructural localization of immune complexes (IgG and C3) at the end-plate in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1978 Mar-Apr;37(2):212-223.
- (80) Engel AG, Lambert EH, Howard FM. Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clin Proc* 1977 May;52(5):267-280.
- (81) Heinemann S, Bevan S, Kullberg R, Lindstrom J, Rice J. Modulation of acetylcholine receptor by antibody against the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Jul;74(7):3090-3094.
- (82) Drachman DB, de Silva S, Ramsay D, Pestronk A. Humoral pathogenesis of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1987;505:90-105.
- (83) Burges J, Wray DW, Pizzighella S, Hall Z, Vincent A. A myasthenia gravis plasma immunoglobulin reduces miniature endplate potentials at human endplates in vitro. *Muscle Nerve* 1990 May;13(5):407-413.
- (84) Tzartos S, Hochschwender S, Vasquez P, Lindstrom J. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the

- main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol* 1987 Jun;15(2):185-194.
- (85) Tzartos SJ, Bitzopoulou K, Gavra I, Kordas G, Jacobson L, Kostelidou K, et al. Antigen-specific apheresis of pathogenic autoantibodies from myasthenia gravis sera. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:291-299.
- (86) Newsom-Davis J, Wilson SG, Vincent A, Ward CD. Long-term effects of repeated plasma exchange in myasthenia gravis. *Lancet* 1979 Mar 3;1(8114):464-468.
- (87) Newsom-Davis J, Vincent A. Combined plasma exchange and immunosuppression in myasthenia gravis. *Lancet* 1979 Sep 29;2(8144):688.
- (88) Janssen SP, Phernambucq M, Martinez-Martinez P, De Baets MH, Losen M. Immunosuppression of experimental autoimmune myasthenia gravis by mycophenolate mofetil. *J Neuroimmunol* 2008 Sep 15;201-202:111-120.
- (89) Rodgaard A, Nielsen FC, Djurup R, Somnier F, Gammeltoft S. Acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: predominance of IgG subclasses 1 and 3. *Clin Exp Immunol* 1987 Jan;67(1):82-88.
- (90) van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martinez-Martinez P, Vermeulen E, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 2007 Sep 14;317(5844):1554-1557.
- (91) Soltys J, Gong B, Kaminski HJ, Zhou Y, Kusner LL. Extraocular muscle susceptibility to myasthenia gravis: unique immunological environment? *Ann N Y Acad Sci* 2008;1132:220-224.
- (92) Molenaar PC, Newsom-Davis J, Polak RL, Vincent A. Choline acetyltransferase in skeletal muscle from patients with myasthenia gravis. *J Neurochem* 1981 Nov;37(5):1081-1088.
- (93) Plomp JJ, Van Kempen GT, De Baets MB, Graus YM, Kuks JB, Molenaar PC. Acetylcholine release in myasthenia gravis: regulation at single end-plate level. *Ann Neurol* 1995 May;37(5):627-636.
- (94) Scadding GK, Vincent A, Newsom-Davis J, Henry K. Acetylcholine receptor antibody synthesis by thymic lymphocytes: correlation with thymic histology. *Neurology* 1981 Aug;31(8):935-943.
- (95) Schluep M, Willcox N, Vincent A, Dhoot GK, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study. *Ann Neurol* 1987 Aug;22(2):212-222.



- (96) Leite MI, Jones M, Strobel P, Marx A, Gold R, Niks E, et al. Myasthenia gravis thymus: complement vulnerability of epithelial and myoid cells, complement attack on them, and correlations with autoantibody status. *Am J Pathol* 2007 Sep;171(3):893-905.
- (97) Scarpino S, Di Napoli A, Stoppacciaro A, Antonelli M, Pillozzi E, Chiarle R, et al. Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol* 2007 Sep;149(3):504-512.
- (98) Strobel P, Rosenwald A, Beyersdorf N, Kerkau T, Elert O, Murumagi A, et al. Selective loss of regulatory T cells in thymomas. *Ann Neurol* 2004 Dec;56(6):901-904.
- (99) Wang YZ, Yan M, Tian FF, Zhang JM, Liu Q, Yang H, et al. Possible involvement of toll-like receptors in the pathogenesis of myasthenia gravis. *Inflammation* 2013 Feb;36(1):121-130.
- (100) Cufi P, Dragin N, Weiss JM, Martinez-Martinez P, De Baets MH, Roussin R, et al. Implication of double-stranded RNA signaling in the etiology of autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2013 Feb;73(2):281-293.
- (101) Guptill JT, Sanders DB. Update on muscle-specific tyrosine kinase antibody positive myasthenia gravis. *Curr Opin Neurol* 2010 Oct;23(5):530-535.
- (102) Romi F, Aarli JA, Gilhus NE. Seronegative myasthenia gravis: disease severity and prognosis. *Eur J Neurol* 2005 Jun;12(6):413-418.
- (103) Sanders DB, El-Salem K, Massey JM, McConville J, Vincent A. Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology* 2003 Jun 24;60(12):1978-1980.
- (104) Niks EH, van Leeuwen Y, Leite MI, Dekker FW, Wintzen AR, Wirtz PW, et al. Clinical fluctuations in MuSK myasthenia gravis are related to antigen-specific IgG4 instead of IgG1. *J Neuroimmunol* 2008 Mar;195(1-2):151-156.
- (105) Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 2002 Jan;105(1):9-19.
- (106) Stone JH, Zen Y, Deshpande V. IgG4-related disease. *N Engl J Med* 2012 Feb 9;366(6):539-551.
- (107) Sitaru C, Mihai S, Zillikens D. The relevance of the IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases. *Arch Dermatol Res* 2007 Apr;299(1):1-8.

- (108) Beck LH, Jr, Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009 Jul 2;361(1):11-21.
- (109) Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA, Scheiflinger F. IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2009 Oct;7(10):1703-1710.
- (110) Shiraishi H, Motomura M, Yoshimura T, Fukudome T, Fukuda T, Nakao Y, et al. Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2005 Feb;57(2):289-293.
- (111) Boneva N, Frenkian-Cuvelier M, Bidault J, Brenner T, Berrih-Aknin S. Major pathogenic effects of anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2006 Aug;177(1-2):119-131.
- (112) Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, Hato N, Yamada H, Jie C, et al. Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 2006 Apr;116(4):1016-1024.
- (113) Cole RN, Reddel SW, Gervasio OL, Phillips WD. Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol* 2008 Jun;63(6):782-789.
- (114) Cole RN, Ghazanfari N, Ngo ST, Gervasio OL, Reddel SW, Phillips WD. Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice. *J Physiol* 2010 Sep 1;588(Pt 17):3217-3229.
- (115) Klooster R, Plomp JJ, Huijbers MG, Niks EH, Straasheijm KR, Detmers FJ, et al. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain* 2012 Apr;135(Pt 4):1081-1101.
- (116) Aarli JA, Stefansson K, Marton LS, Wollmann RL. Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin. *Clin Exp Immunol* 1990 Nov;82(2):284-288.
- (117) Mygland A, Tysnes OB, Matre R, Volpe P, Aarli JA, Gilhus NE. Ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis patients with a thymoma. *Ann Neurol* 1992 Oct;32(4):589-591.
- (118) Gautel M, Lakey A, Barlow DP, Holmes Z, Scales S, Leonard K, et al. Titin antibodies in myasthenia gravis: identification of a major immunogenic region of titin. *Neurology* 1993 Aug;43(8):1581-1585.

- (119) Suzuki S, Satoh T, Yasuoka H, Hamaguchi Y, Tanaka K, Kawakami Y, et al. Novel autoantibodies to a voltage-gated potassium channel Kv1.4 in a severe form of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2005 Dec 30;170(1-2):141-149.
- (120) 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;259(7):1312-1316.
- (121) Mier AK, Havard CW. Diaphragmatic myasthenia in mother and child. *Postgrad Med J* 1985 Aug;61(718):725-727.
- (122) Mossman S, Vincent A, Newsom-Davis J. Myasthenia gravis without acetylcholine-receptor antibody: a distinct disease entity. *Lancet* 1986 Jan 18;1(8473):116-119.
- (123) Burges J, Vincent A, Molenaar PC, Newsom-Davis J, Peers C, Wray D. Passive transfer of seronegative myasthenia gravis to mice. *Muscle Nerve* 1994 Dec;17(12):1393-1400.
- (124) 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 Jul;131(Pt 7):1940-1952.
- (125) Jacob S, Viegas S, Leite MI, Webster R, Cossins J, Kennett R, et al. Presence and pathogenic relevance of antibodies to clustered acetylcholine receptor in ocular and generalized myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2012 Aug;69(8):994-1001.
- (126) Yang L, Maxwell S, Leite MI, Waters P, Clover L, Fan X, et al. Non-radioactive serological diagnosis of myasthenia gravis and clinical features of patients from Tianjin, China. *J Neurol Sci* 2011 Feb 15;301(1-2):71-76.
- (127) Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2011 Feb;69(2):418-422.
- (128) Pevzner A, Schoser B, Peters K, Cosma NC, Karakatsani A, Schalke B, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol* 2012 Mar;259(3):427-435.
- (129) Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, Ragheb S, Bealmear B, Lewis RA, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol* 2012 Apr;69(4):445-451.
- (130) Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, Huang JH, et al. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 2008 Oct 17;135(2):334-342.

- (131) Huze C, Bauche S, Richard P, Chevessier F, Goillot E, Gaudon K, et al. Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am J Hum Genet* 2009 Aug;85(2):155-167.
- (132) Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, et al. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 1996 May 17;85(4):525-535.
- (133) Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Gallardo E, Juarez C, Martinez-Domeno A, Martinez-Ramirez S, et al. Antibodies to AChR, MuSK and VGKC in a patient with myasthenia gravis and Morvan's syndrome. *Nat Clin Pract Neurol* 2007 Jul;3(7):405-410.
- (134) Illa I, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Pradas J, Rey A, Blesa R, et al. Sustained response to Rituximab in anti-AChR and anti-MuSK positive Myasthenia Gravis patients. *J Neuroimmunol* 2008 Sep 15;201-202:90-94.
- (135) Kummer TT, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR. Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus. *J Cell Biol* 2004 Mar 29;164(7):1077-1087.
- (136) Buchhalter JR, Dichter MA. Electrophysiological comparison of pyramidal and stellate nonpyramidal neurons in dissociated cell culture of rat hippocampus. *Brain Res Bull* 1991 Mar;26(3):333-338.
- (137) Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 2009 Apr;65(4):424-434.
- (138) Anderson LV, Davison K, Moss JA, Richard I, Fardeau M, Tome FM, et al. Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am J Pathol* 1998 Oct;153(4):1169-1179.
- (139) Pasnoor M, Wolfe GI, Nations S, Trivedi J, Barohn RJ, Herbelin L, et al. Clinical findings in MuSK-antibody positive myasthenia gravis: a U.S. experience. *Muscle Nerve* 2010 Mar;41(3):370-374.
- (140) Zaghera E, Ozaita A, Chang SY, Nadal MS, Lin U, Saganich MJ, et al. DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem* 2005 May 13;280(19):18853-18861.
- (141) Jerng HH, Kunjilwar K, Pfaffinger PJ. Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J Physiol* 2005 Nov 1;568(Pt 3):767-788.

- (142) Maffie JK, Dvoretzkova E, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF, Rudy B. Dipeptidyl-peptidase-like-proteins confer high sensitivity to the scorpion toxin AmmTX3 to Kv4-mediated A-type K<sup>+</sup> channels. *J Physiol* 2013 May 15;591(Pt 10):2419-2427.
- (143) Dai Z, Luo X, Xie H, Peng HB. The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters. *J Cell Biol* 2000 Sep 18;150(6):1321-1334.
- (144) Madhavan R, Gong ZL, Ma JJ, Chan AW, Peng HB. The function of cortactin in the clustering of acetylcholine receptors at the vertebrate neuromuscular junction. *PLoS One* 2009 Dec 29;4(12):e8478.
- (145) Peng HB, Xie H, Dai Z. Association of cortactin with developing neuromuscular specializations. *J Neurocytol* 1997 Oct;26(10):637-650.
- (146) Blum S, Gillis D, Brown H, Boyle R, Henderson R, Heyworth-Smith D, et al. Use and monitoring of low dose rituximab in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011 Jun;82(6):659-663.
- (147) Joly P, Mouquet H, Roujeau JC, D'Incan M, Gilbert D, Jacquot S, et al. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *N Engl J Med* 2007 Aug 9;357(6):545-552.
- (148) van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013 Apr;131(4):1204-1212.
- (149) Leite MI, Coutinho E, Lana-Peixoto M, Apostolos S, Waters P, Sato D, et al. Myasthenia gravis and neuromyelitis optica spectrum disorder: a multicenter study of 16 patients. *Neurology* 2012 May 15;78(20):1601-1607.
- (150) Zisimopoulou P, Brenner T, Trakas N, Tzartos SJ. Serological diagnostics in myasthenia gravis based on novel assays and recently identified antigens. *Autoimmun Rev* 2013 Jul;12(9):924-930.
- (151) Jerng HH, Pfaffinger PJ, Covarrubias M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 2004 Dec;27(4):343-369.
- (152) Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010 Aug;9(8):776-785.
- (153) Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma

inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 2010 Sep;133(9):2734-2748.

- (154) Boronat A, Gelfand JM, Gresa-Arribas N, Jeong HY, Walsh M, Roberts K, et al. Encephalitis and antibodies to dipeptidyl-peptidase-like protein-6, a subunit of Kv4.2 potassium channels. *Ann Neurol* 2013 Jan;73(1):120-128.
- (155) Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology* 2011 Jul 12;77(2):179-189.