



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**Expresión de Receptores Tipo Toll (*Toll-like Receptors*) de Superficie en
Leucocitos Circulantes de Pacientes con Miastenia Gravis.**

Papel de la Inmunidad Innata en la Patogenia de la Enfermedad

Tesis presentada por Gustavo Zapata Wainberg para la obtención del grado de doctor

Dirección:

Dr. José Vivancos Mora

Dra. Cecilia Muñoz Calleja

Madrid

2018

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a Gisela por haberme acercado desde tan pequeño a la medicina y a la investigación, a Gustavo por enseñarme el pragmatismo.

A Sarita que siempre me apoya y se ilusiona con cada paso adelante.

A Lucía por alegrar cualquier momento.

Al Dr. Álvaro Ximénez-Carrillo por el impulso y la colaboración para llevar a cabo esta tarea.

A la Dra Mónica Sobrado por su indispensable ayuda en el diseño y desarrollo de este proyecto.

A Candelas Álvarez y Clara Aguirre por su valiosa contribución.

Al personal del Banco de Sangre y los técnicos de citometría del Hospital de La Princesa.

A los pacientes, alfa y omega del quehacer del médico.

A la Dra. Cecilia Muñoz Calleja que desde el primer planteamiento de esta investigación demostró la mayor disposición para llevarla a cabo.

Al Dr. José Vivancos Mora, es por su actitud ejemplar que siempre nos vemos obligados a avanzar.

A lo largo de toda mi vida, las nuevas escenas de la naturaleza me hicieron alegrarme como un niño.

Maria Salomea Skłodowska

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	5
RELACIÓN DE TABLAS	8
RELACIÓN DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN	21
Sobre la miastenia gravis	21
Epidemiología.....	22
Fisiopatología e Inmunopatogenia.....	23
El timo en la patogenia de la MG	25
Papel de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en la patogenia de la MG	26
Del antiRACH al trastorno neurofisiológico	27
Modelo animal	30
Características clínicas.....	31
Exploraciones complementarias	34
Tratamiento.....	35
Los receptores tipo Toll (<i>Toll-Like Receptors</i> , TLR)	37
Estructura, activación y señalización	39
Los TLR y su relación con la autoinmunidad y la miastenia gravis.....	45

TLR y terapéutica.....	47
Justificación del Proyecto	48
HIPÓTESIS	50
OBJETIVOS	50
Objetivo principal.....	50
Objetivos secundarios.....	50
PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	52
Diseño del estudio, pacientes y controles	52
Análisis de expresión de TLR.....	56
Niveles de anticuerpos antiRCh.....	60
Análisis estadístico	60
RESULTADOS.....	62
Características de la muestra	62
Expresión de TLR de superficie en leucocitos circulantes.....	65
Expresión de TLR en Linfocitos B	66
Expresión de TLR en Células NK.....	67
Expresión de TLR en Linfocitos T CD4+.....	68
Expresión de TLR Linfocitos T CD8+.....	69
Expresión de TLR en Células Dendríticas	70
Expresión de TLR en Monocitos	71

Expresión en Neutrófilos	72
Expresión de TLR de superficie en linfocitos B y correlación con los niveles de antiRACH.....	73
Expresión de TLR4 en Células NK y su correlación con los niveles de antiRACH	75
Correlación entre expresión de TLR y edad	76
Expresión de TLR y parámetros clínicos	77
DISCUSIÓN	79
Expresión de TLR en Linfocitos B y su relación con la Miastenia Gravis	79
Expresión de TLR en células NK y su relación con la Miastenia Gravis.....	82
Aspectos Clínicos.....	87
Limitaciones del estudio	87
Perspectivas futuras.....	88
CONCLUSIONES.....	90
REFERENCIAS	93
CRÉDITOS DE LAS ILUSTRACIONES	102
ANEXOS.....	104
ÍNDICE ANALÍTICO	106

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Ligandos endógenos y exógenos de los TLR humanos	40
Tabla 2. Escala MG-Composite	54
Tabla 3. Escala MGFA	55
Tabla 4. Características de la Muestra.....	63
Tabla 5. Distribución porcentual de linfocitos y células NK.....	64
Tabla 6. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en linfocitos B	66
Tabla 7. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Células NK.....	67
Tabla 8. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Linfocitos T CD4+	68
Tabla 9. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en linfocitos T CD8+	69
Tabla 10. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Células Dendríticas	70
Tabla 11. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Monocitos.....	71
Tabla 12. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Neutrófilos.....	72
Tabla 13. Análisis de la Expresión de TLR y su relación con parámetros clínicos	77

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1 Estimulación nerviosa repetitiva.	29
Figura 2. Debilidad palpebral en un paciente con MG	32
Figura 3. Estructura molecular de los TLR.	39
Figura 4. Para su activación, los TLR deben formar dímeros.....	42
Figura 5. Cascada de señalización intracelular de los TLR	43
Figura 6. Esquema de la estrategia de selección de células utilizada en el estudio	58
Figura 7. Uso de la técnica FMO	59
Figura 8. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Linfocitos B	66
Figura 9. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Células NK	67
Figura 10. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Linfocitos T CD4+	68
Figura 11. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Linfocitos T CD8+	69
Figura 12. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Células Dendríticas	70
Figura 13. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Monocitos.....	71
Figura 14. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Neutrófilos.....	72
Figura 15. Correlación entre la expresión de TLR4 en linfocitos B y los niveles séricos de antiRACH	73
Figura 16. Correlación entre los niveles de antiRACH y el porcentaje de linfocitos B TLR6+	74
Figura 17. Correlación entre los niveles de antiRACH y el porcentaje de células NK TLR4+.....	75
Figura 18. Correlación entre el porcentaje de TLR de cada célula y la edad.	76
Figura 19. Visión integrada de nuestros hallazgos en la patogenia de la MG	86

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ACh	Acetilcolina
ANCA	Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos
antiRACH	Anticuerpos anti receptor colinérgico
AP-1	Proteína activadora 1
APRIL	A proliferation-inducing ligand
BAFF	B-Cell-activating factor
CCL21	C-C Motif Chemokine Ligand 21
CPA	Células presentadoras de antígenos
CXCL#	C-X-C Motif Chemokine Ligand
DAMP	Damage associated molecular patterns
ENR	Estimulación nerviosa repetitiva
FMO	Fluorescence minus one
FoxP3	Forkhead Box P3
HMGB-1	High mobility group box 1
IFN	Interferón
IRAK	Cinasa asociada al receptor de IL-1
IRF	Interferon Regulatory Factor
IVIG	Inmunoglobulinas intravenosas
LPS	Lipopolisacárido
LTCD4	Linfocitos T CD4+
LTCD8	Linfocitos T CD8+
MG	Miastenia gravis
MGFA	Myasthenia gravis foundation association, Asociación de la Miastenia Gravis (EEUU)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MuSK	Muscle-Specific Kinase
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, células mononucleares de sangre periférica
PLEX	Plasmaféresis
PRR	Pattern-recognition receptors, receptores que reconocen patrones
RACH	Receptor de acetilcolina
RT-Q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa
SFEMG	Single fiber electromyography, electromiografía de fibra aislada
TIR	Receptor Toll/IL-1
TIRAP	Proteína adaptadora con dominio TIR (También MAL)
TRAM	Molécula adaptadora asociada a TRIF (También TICAM2)
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad autoinmune asociada a la presencia de anticuerpos contra el receptor de acetilcolina (antiRACH) de la placa muscular del músculo esquelético, su característica clínica fundamental es la presencia de debilidad con fatigabilidad, esto es, la debilidad que empeora en la medida en la que aumenta la actividad muscular.

Epidemiología

La MG es una enfermedad infrecuente y está reconocida como una enfermedad rara. Su incidencia tiene una distribución etaria bimodal, con picos en la tercera y sexta décadas de la vida y es ligeramente más frecuente en mujeres (3:2). En los últimos años su incidencia ha ido aumentando probablemente en relación con el envejecimiento de la población y actualmente puede considerarse una enfermedad más frecuente en personas mayores.

Patogenia

El antígeno contra el que se produce la respuesta autoinmune en la MG es el receptor de acetilcolina (RACH); este canal iónico de la placa muscular es permeable selectivamente para sodio y potasio y es su subunidad α contra la que se dirigen específicamente los autoanticuerpos que producen la enfermedad.

Los antiRACH se unen al RACH y generan una respuesta inmunitaria local, mediada por el complemento, y este mecanismo es el principal responsable del deterioro de la

transmisión neuromuscular. Además, los antiRACH fomentan la formación de dímeros del receptor colinérgico, lo que aumenta su degradación y en menor medida bloquean la unión de la acetilcolina (ACh).

El proceso inmunopatológico está mediado por los linfocitos T CD4 y los linfocitos B serían los efectores intermediarios al producir los antiRACH. En la MG los linfocitos T reguladores tienen menor función supresora de la tolerancia al RACH lo que permite que se desarrollen linfocitos B autorreactivos. La activación del complemento sobre la placa motora por el depósito de antiRACH explica que existan infiltrados de linfocitos sobre la placa. Además, los niveles elevados del factor activador del linfocito B (BAFF, del inglés *B-Cell-activating factor*) que se encuentran en pacientes con MG implicaría que la supervivencia de los linfocitos B esté aumentada puesto que disminuye su capacidad apoptótica.

Clínica

La debilidad muscular de la miastenia afecta principalmente a los músculos que permanecen activos de forma tónica, así, la gran mayoría de los pacientes tienen debilidad palpebral (ptosis) y oftalmoparesia, también es frecuente la presencia de debilidad fatigable en los músculos bulbares que se manifiesta como disartria, disfagia o debilidad cervical. Aunque al inicio de la enfermedad pueden afectarse sólo los músculos palpebrales y extraoculares, quedando la enfermedad limitada a esa zona (miastenia ocular), el cuadro puede progresar y hacerse generalizado, típicamente en los primeros dos años de evolución.

Tratamiento

El tratamiento médico de la MG tiene tres pilares fundamentales, el tratamiento sintomático con inhibidores de la acetilcolinesterasa, la inmunosupresión (corticoides, azatioprina, micofenolato, ciclosporina, tacrolimus, rituximab, entre otros) y la timectomía. El objetivo del tratamiento es que el paciente no tenga síntomas ni afectación funcional en sus actividades diarias producto de la enfermedad y que no tenga efectos secundarios relevantes de la medicación. En los casos de crisis miasténica (o de reagudizaciones graves, aunque no exista insuficiencia respiratoria) se indican inmunoglobulinas intravenosas (IVIG, del inglés *Intravenous Immunoglobulins*) o plasmaféresis.

Los receptores tipo Toll (TLR, *Toll-like receptors*).

Estos receptores son proteínas transmembrana que forman parte del sistema inmunitario innato, se expresan en la superficie de los leucocitos (neutrófilos, monocitos, linfocitos B, linfocitos T CD4 y CD8, células NK y células dendríticas) y en humanos conforman una familia de 10 receptores. Sus ligandos son de lo más diversos, los denominados PAMP (del inglés, *Pathogen associated molecular patterns*) y DAMP (del inglés, *Damage associated molecular patterns*), desde moléculas pequeñas como el ácido úrico, pasando por polisacáridos, complejos de lípidos y polisacáridos (como el lipopolisacárido, LPS), proteínas como la flagelina, hasta estructuras complejísimas como la LDL oxidada o el ADN, esto permite que el sistema inmunitario tenga la capacidad de detectar la presencia de virus, bacterias, hongos y parásitos. Adicionalmente estos receptores también son capaces de detectar la presencia de lesiones tisulares del propio organismo al unirse a moléculas como las proteínas de

choque térmico (hsp, del inglés *heat shock proteins*), las defensinas y la proteína HMGB-1 (del inglés, *High mobility group box 1*). Los TLR de superficie (en los que se centra este trabajo) son TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10, mientras que TLR3, 7, 8 y 9 se expresan en vesículas intracelulares. Tras la unión a su ligando correspondiente forman dímeros que desencadenan una cascada de señalización intracelular (vía MyD88 [del inglés *Myeloid differentiation primary response 88*] y vía TRIF [del inglés *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*]) que finalmente conlleva al aumento de la transcripción de los genes de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12) y a la activación del inflammasoma.

Se ha demostrado que la transcripción de los genes que codifican para los TLR se encuentra aumentada en los leucocitos circulantes de pacientes con MG, sin embargo, no se ha estudiado previamente su expresión proteica en cada tipo celular en particular y esta información ayudaría a dilucidar si dichos receptores participan en la patogenia de la enfermedad.

HIPÓTESIS

La expresión de receptores TLR de superficie en leucocitos circulantes es diferente en pacientes con MG en comparación con controles sanos.

OBJETIVOS

Objetivo principal

- Analizar, usando citometría de flujo, la expresión proteica de los receptores TLR de superficie en leucocitos circulantes de pacientes con MG en comparación con individuos sanos.

Objetivos secundarios

- Correlacionar la expresión de TLR de superficie en leucocitos circulantes en pacientes con MG generalizada con:
 - Gravedad de la enfermedad
 - Niveles séricos de antiRACH
 - Tratamiento inmunosupresor actual
 - Presencia o antecedente de timoma

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

Realizamos un estudio observacional, analítico, unicéntrico, con inclusión prospectiva de pacientes. Los criterios de inclusión fueron: (i) diagnóstico de MG basado en la presencia de clínica típica de la enfermedad, resultados positivos de anticuerpos antiRACH ($> 0,45$ nmol/L) y alteración neurofisiológica compatible con afectación postsináptica de la transmisión neuromuscular, (ii) mayores de 18 años y (iii) firma de consentimiento informado. Excluimos a los pacientes que tuvieran otra enfermedad inmunológica, inflamatoria o infecciosa activa que pudiera interferir en los resultados del análisis. De cada caso se recogieron variables demográficas, clínicas y terapéuticas que se almacenaron de forma anonimizada en una base de datos diseñada a tal efecto. La situación clínica se midió por las escalas MG-Composite cuyo valor fue medido y registrado el día de la inclusión en el estudio y de la extracción de la muestra y la escala MGFA de la que se registró la clase en el día de la inclusión y también se recogió su valor máximo desde el inicio de la enfermedad según constase en la historia clínica del paciente.

Los controles fueron sujetos sanos donantes de sangre que acudían voluntariamente al Banco de Sangre del Hospital Universitario de La Princesa, debían ser personas mayores de 18 años y que no tuvieran enfermedades inmunológicas, inflamatorias o infecciosas activas, los sujetos de control también debían firmar un consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio. El estudio contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de La Princesa (Nº de Registro: PI-799).

Para el análisis de la expresión de TLR se obtuvieron de cada sujeto 10 mL de sangre heparinizada, el mismo día se realizó una inmunofluorescencia directa con anticuerpos contra CD14, CD16/56, CD3, CD4, CD19, TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10. El análisis por citometría se realizó en las primeras 24 horas de la extracción y los puntos de corte para el *gating* de los diferentes TLR se estableció por medio de la técnica FMO (del inglés *fluorescence minus one*). Los niveles de antiRACH se determinaron por medio de ELISA.

Se realizó el análisis estadístico de asociación y correlación de las diferentes variables.

RESULTADOS

En el estudio se incluyeron 10 pacientes con MG y 11 controles sanos, la edad en el grupo de pacientes fue significativamente mayor que el control (66,0 años [58,2-73,2] vs (43,0 años [26,5-47,0]; $p= 0.01$). No hubo diferencias en cuanto a la distribución por sexos. El 70% (7) de los pacientes estaba en tratamiento con prednisona en el momento de su inclusión en el estudio, el 10% (1) estaba en tratamiento con azatioprina. La mitad de los pacientes estaban asintomáticos. A 4 (40%) de los pacientes se les había realizado

timectomía, a 3 de ellos por timoma (de los cuales eran uno por cada una de las categorías: A, AB y B3) y a 1 como tratamiento de la enfermedad.

En cuanto a la expresión de TLR de superficie, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los siguientes casos:

- Mayor porcentaje de linfocitos B TLR2+ en pacientes con MG respecto a controles (medianas= 11,8% [p25: 5,7; p75: 35,2] vs 5.1% [p25: 3,5; p75: 6,0], tamaño del efecto: 0.47; p = 0,035).
- Mayor porcentaje de linfocitos B TLR4+ en pacientes con MG respecto a controles (medianas= 15,4% [p25: 8,4; p75: 24,4] vs 7.8% [p25: 4,2; p75: 10,9], tamaño del efecto: 0,46; p = 0,038).
- Mayor porcentaje de células NK TLR4+ en pacientes con MG respecto a controles (medianas = 22,6 [p25: 16,4; p75: 38,3] vs 13,9 [p25: 4,6; p75: 15,7], tamaño del efecto: 0,45; p=0,045)

Los niveles de antiRACH se correlacionaron positivamente con el porcentaje de linfocitos B TLR4+ ($R^2 = 0.512$; p = 0.03), el porcentaje de linfocitos B TLR6+ ($R^2 = 0,535$, p = 0,025) y el porcentaje de células NK TLR4+ ($R^2 = 0,475$; p = 0,04).

Analizamos la expresión de los TLR en los leucocitos que resultaron significativamente diferentes entre los grupos en estudio y no encontramos diferencias en cuanto a sexo, tratamiento actual con prednisona, antecedente de timoma y situación clínica del paciente (escalas MGCS y MGFA).

CONCLUSIÓN

De nuestros resultados se puede concluir que los pacientes con MG presentan una mayor expresión de TLR2 y TLR4 en linfocitos B y células NK circulantes que podría explicar en parte la patogenia de base inmunitaria de la enfermedad, ya que el porcentaje de expresión de dichas moléculas se correlaciona con los niveles del anticuerpo antiRACH.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Sobre la miastenia gravis

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad neuromuscular autoinmune que se asocia a la presencia de autoanticuerpos contra el receptor nicotínico de acetilcolina del músculo esquelético (RACH), u otros anticuerpos como se mencionará más adelante, que se caracteriza, desde el punto de vista clínico, por la presencia de debilidad muscular generalmente fluctuante. Típicamente la debilidad miasténica aumenta en la medida en la que se incrementa la actividad muscular, fenómeno conocido como fatigabilidad. La primera descripción científica se atribuye a Thomas Willis¹ (1621-1675) que en su libro *De Anima Brutorum* (1672) menciona un caso de una paciente con debilidad de larga evolución: *“(…) Hay otra forma de esta enfermedad que depende de la ausencia de espíritu y en la cual falla el movimiento (...), estas personas son capaces de despertarse por la mañana y caminar, mover sus brazos de una u otra forma y de levantar peso con fuerza pero antes de la tarde, agotadas las reservas de espíritu que influenciaban al músculo, estas son incapaces de mover las manos o los pies. Ahora tengo en tratamiento a una mujer prudente y honesta que durante muchos años se ha visto afectada por esta desgraciada parálisis, no sólo en sus extremidades sino también en su lengua; esta persona puede hablar durante un tiempo sin problemas pero tras un discurso largo, rápido o laborioso, rápidamente enmudece como un pez y no puede soltar ni una palabra, ni una, y no se recuperará hasta una o dos horas después”*. Las descripciones modernas de la enfermedad se las debemos a Wilhelm Erb y Samuel Goldflam (por lo que durante años esta se denominó síndrome de Erb-Goldflam) pero fue Friedrich Jolly

quien acuñó el término miastenia gravis (pseudoparalítica) en 1895². Desde entonces se han podido dilucidar casi por completo las características clínicas, inmunológicas, neurofisiológicas y terapéuticas de la MG que pasaremos a describir a continuación.

Epidemiología

La MG es una enfermedad infrecuente, con una incidencia de 5,3 casos (1,7-21,3) por millón de habitantes al año y una prevalencia que ronda los 77,7 (15-179) casos por millón de habitantes³ por lo que está reconocida como una enfermedad “rara” (ORPHANET: 589). Considerada tradicionalmente una enfermedad de mujeres jóvenes, actualmente se sabe que tiene una distribución bimodal con picos en la tercera y sexta décadas de la vida y con una relación de 3:2 en cuanto distribución por sexos (femenino:masculino)⁴. La incidencia de la enfermedad ha ido aumentando a lo largo de los últimos 40 años y este incremento parece asociarse específicamente con el envejecimiento de la población, por lo que actualmente podríamos considerar que esta es una enfermedad de mayor frecuencia en personas mayores⁴⁻¹¹. En España se ha estudiado la epidemiología de la MG, concretamente en la Isla de la Palma, donde se describió en 1996 una prevalencia de 8,5 casos por 100000 habitantes¹², un estudio prospectivo en Osona (Barcelona) permitió determinar una incidencia de 21,2 casos por millón en el periodo 1991-2000⁷, más recientemente el mismo grupo estudió en esa localidad la prevalencia de la enfermedad situándola en 32,9 casos por cien mil habitantes (95%CI: 23.86-41.91)¹³.

Fisiopatología e Inmunopatogenia

En la MG el antígeno fundamental contra el que está dirigida la respuesta autoinmune es el receptor de acetilcolina nicotínico muscular (RACH), este receptor se encuentra en la membrana de la placa motora y es un canal iónico con permeabilidad selectiva para sodio y potasio. El receptor está formado por cuatro subunidades denominadas α , β , δ y ϵ . Las subunidades α y δ del humano se encuentran codificadas en el cromosoma 2 y las subunidades β y ϵ en el cromosoma 17. Las diferentes subunidades del RACH son homólogas entre humanos y otras especies y la secuencia de la subunidad α es la que presenta la mayor conservación¹⁴⁻¹⁶.

La transmisión neuromuscular, de forma resumida, tiene la siguiente secuencia de acontecimientos: llegada del potencial de acción a la terminal axonal de la motoneurona, este potencial de acción activa la liberación de la acetilcolina (ACh) que se encuentra almacenada dentro de vesículas citoplásmicas; una vez liberada, la ACh difunde a través de la hendidura sináptica hasta la membrana de la placa muscular, ahí se une de forma reversible a la subunidad α del RACH, al unirse esta al receptor se induce un cambio conformacional que aumenta la permeabilidad de la membrana al sodio y al potasio y la generación de múltiples potenciales de pequeño voltaje (potenciales de placa) que al sumarse generan una diferencia de potencial lo suficientemente grande como para desencadenar el potencial de acción muscular que se propaga a lo largo del sarcolema y la consecuente contracción del músculo esquelético. Sabiendo esto, se entiende que si disminuye el número de receptores disponibles la liberación de ACh no se traducirá en la generación de potenciales de acción en la célula muscular; además, conviene mencionar que la cantidad de ACh disponible en la terminal axonal es finita

por lo que al aumentar la frecuencia de disparo de la neurona motora la ACh disponible acaba por agotarse lo que también contribuirá a que no se produzca la consecuente contracción muscular.

Los pacientes con MG tienen anticuerpos contra el RACH (antiRACH) y estos son los responsables del deterioro de la transmisión neuromuscular, son anticuerpos IgG (predominantemente de los subtipos IgG1 e IgG3) que se depositan junto con el complemento (C3 y complejo de ataque terminal [C5-C9]) en la membrana postsináptica. La mayor concentración de células B y plasmáticas productoras de antiRACH se encuentran en los centros germinales del timo hiperplásico. El suero de pacientes con MG induce la enfermedad al administrárselo a ratones, que tras la transferencia desarrollan debilidad y alteraciones neurofisiológicas que revierten con la administración de un agente anticolinesterásico¹⁷, lo que demuestra que los anticuerpos son patogénicos; este hecho también explicaría el desarrollo de miastenia neonatal en hijos de mujeres con MG. El 60% de los anticuerpos patogénicos están dirigidos contra una porción específica de la subunidad α del RACH que se denomina región inmunogénica principal^{18,19}. Hay que destacar que la enfermedad puede estar asociada a otros autoanticuerpos dirigidos contra otras proteínas de la membrana postsináptica de la unión neuromuscular. En concreto, entre un 1 y 10% de los casos se producen por anticuerpos contra la kinasa específica del músculo (antiMuSK, del inglés *Muscle-Specific Kinase*) y entre un 1 y 3% contra la proteína LRP4 (del inglés *low density lipoprotein receptor-related protein 4*)²⁰ y más recientemente se han descrito pacientes que presentan anticuerpos contra la cortactina²¹; estas tres últimas entidades producen cuadros clínicos con algunas particularidades diferenciales, sin embargo, están fuera del objetivo de este trabajo y nos limitaremos aquí a estudiar la MG asociada a antiRACH.

El timo en la patogenia de la MG

Se ha propuesto que la inmunopatogenia de la enfermedad varía dependiendo de determinadas características de los pacientes²². Así, en la enfermedad de inicio en la juventud frecuentemente existe hiperplasia tímica, el timo hiperplásico contiene centros germinales que parecen ser el centro de la respuesta de los linfocitos B contra el RACH y además los linfocitos tímicos de estos pacientes producen antiRACH in vitro; en la enfermedad de inicio tardío, por el contrario, el timo suele ser normal, salvo que sea el caso de la enfermedad asociada a timoma. En cualquier caso, el papel del timo es crítico en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. Marx et al²³ resumen los hechos que permiten establecer esta relación:

- Las células mioides de la médula tímica expresan RACH y en la MG estas células evidencian depósitos de complemento y antiRACH en su superficie.
- Las células presentadoras de antígenos (CPA) están cercanas a las células mioides y probablemente presentan los péptidos procesados del RACH a células T autorreactivas cercanas.
- La hiperplasia folicular linfoide del timo que se asocia con la MG se acompaña de cambios estructurales, los espacios perivascuales se encuentran infiltrados por linfocitos B y T que forman centros germinales, esto produce disrupción de la capa de células epiteliales y de la lámina basal del espacio perivascular, lo que desencadena el desplazamiento de las células mioides desde la médula (zona tolerogénica) hacia los folículos linfoides, y la hiperplasia de las células epiteliales medulares que expresan subunidades del RACH, lo que favorece la presentación a los linfocitos T de péptidos inmunogénicos derivados del RACH.

- Existe en el timo una sobreexpresión de determinadas citocinas (CXCL12 [del inglés *C-X-C Motif Chemokine Ligand*], CXCL13, CCL21 [del inglés *C-C Motif Chemokine Ligand 21*], APRIL [del inglés *A proliferation-inducing ligand*] y BAFF) que contribuye al reclutamiento de linfocitos B y células dendríticas hacia el timo.
- Los linfocitos T reguladores intratímicos en la MG son funcionalmente defectuosos (menor expresión de FoxP3 [del inglés *Forkhead box P3*]).

El modelo propuesto^{23,24} del proceso intratímico en la patogenia de la enfermedad comprendería un primer paso en el que las células epiteliales medulares MHC-I y MHC-II positivas presentan subunidades del RACH a los linfocitos T colaboradores (*priming*) y un segundo paso en el que los anticuerpos producidos tras la interacción entre los linfocitos T activados y los linfocitos B, atacan a las células mioides activando localmente el complemento con la subsecuente liberación de complejos RACH/antiRACH lo que activaría a las CPA, desencadenaría la formación de centros germinales y la diversificación de los autoanticuerpos.

Papel de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en la patogenia de la MG

Puesto que la MG es una enfermedad mediada por autoanticuerpos, es lógico plantear que el linfocito B tenga un papel central en la génesis y la persistencia de la enfermedad. Los anticuerpos que median la enfermedad son de la subclase IgG1, adaptados tras un proceso de hipermutación somática, por lo que se plantea que el proceso inmunopatológico esté mediado por los linfocitos TCD4. Parece por tanto claro que en la MG se da un fallo de la tolerancia inmunológica que afecta tanto a los linfocitos T como a los B. Por una parte, los linfocitos T reguladores (Treg) tienen defectos en su

funcionamiento en los pacientes con MG²⁵, tienen una menor función supresora, menor expresión de FoxP3 y por tanto un fallo en la supresión de la tolerancia al RCh. Este fallo de la tolerancia permitiría a los linfocitos B autorreactivos ante el RCh proliferar y madurar la especificidad ante el RCh. Así, en la MG se pueden encontrar linfocitos B, tanto circulantes como en el timo, que producen de forma específica y policlonal anticuerpos antiRCh, existe una correlación directa positiva entre el número de células circulantes y la presencia de hiperplasia tímica y un título elevado de antiRCh²⁶, además el infiltrado inflamatorio presente en la placa muscular de pacientes con MG²⁷ está compuesto por linfocitos T y B aunque sus especificidades moleculares todavía no se han descrito. Además, la subpoblación de linfocitos B reguladores parece estar disminuida e hipofuncionante en pacientes con MG, lo que conllevaría una menor capacidad de éstas de regular la proliferación de los linfocitos TCD4, defecto que se correlaciona clínicamente con la gravedad de la enfermedad^{28,29}. También es probable que los linfocitos B autorreactivos tengan una mayor supervivencia por una menor actividad apoptótica, en probable relación con el hecho de que en pacientes con MG existen mayores niveles de BAFF en comparación con controles sanos³⁰. Le Panse³¹ propone un modelo de la etiopatogenia de la enfermedad en la que un desencadenante, como una infección viral, generaría un ambiente proinflamatorio en el timo, mediado por interferones, que conduciría al desarrollo de células Treg defectuosas y a la proliferación de linfocitos B autorreactivos que producen antiRCh.

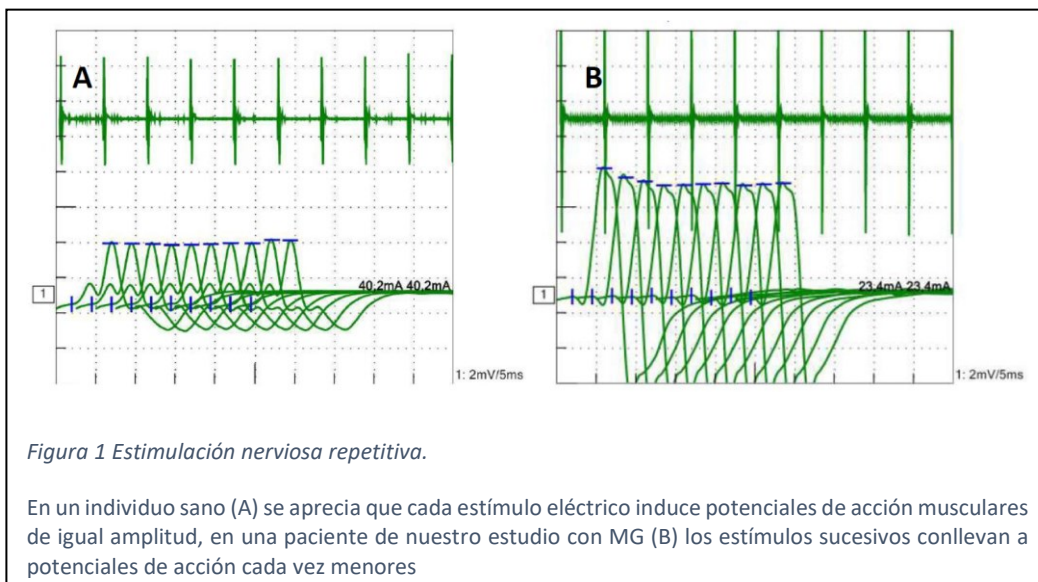
Del antiRCh al trastorno neurofisiológico

En la MG la alteración de la transmisión neuromuscular, que es la vía final común que produce las manifestaciones clínicas, se explica por tres mecanismos: (i) La reacción

antígeno-anticuerpo conlleva el depósito de complemento en la placa motora lo que permite que se desarrolle una respuesta inmunológica local, con la consiguiente destrucción de la arquitectura normal de la placa, particularmente en los pliegues postsinápticos donde existe la mayor concentración de RCh, estos pliegues desaparecen, se ensancha la hendidura sináptica y la activación local del complemento produce una ruptura de la membrana postsináptica, (ii) los antiRCh dimerizan los receptores colinérgicos lo que aumenta su tasa de degradación al sufrir endocitosis mediada por clatrina y (iii) la presencia del antiRCh unido al receptor bloquea el sitio de unión de la acetilcolina; de todo esto se desprende que disminuye la concentración de RCh en la placa motora y que los receptores disponibles quedan inutilizados lo que conlleva a la ausencia de contracciones musculares tras la liberación de ACh desde la terminal sináptica¹⁶.

El defecto de la transmisión neuromuscular se puede demostrar en la práctica clínica por medio del estudio neurofisiológico realizando al paciente la prueba de la estimulación nerviosa repetitiva que consiste en realizar estímulos eléctricos en salvas a determinadas frecuencias y registrar la amplitud del potencial de acción compuesto muscular secundario a cada uno de esos estímulos. En condiciones normales, con cada estímulo eléctrico la terminal axonal de la neurona motora libera una determinada cantidad de ACh, por lo que la disponibilidad de ésta va disminuyendo progresivamente; la ACh se libera siempre en la misma proporción (cerca al 20%) del depósito disponible, así que al disminuir el depósito disminuye la cantidad absoluta de ACh que llega al espacio de la hendidura sináptica, en consecuencia disminuirá también la amplitud de los potenciales postsinápticos que igualmente generarán un potencial de acción muscular porque seguirá siendo suficiente para alcanzar el umbral

correspondiente (factor de seguridad). En la MG, al estar lesionada la membrana postsináptica (placa muscular) y haber menos receptores colinérgicos disponibles, cuando se produce el descenso fisiológico de la ACh tras estímulos repetidos, aumenta la probabilidad de que la ACh liberada no active los receptores suficientes como para generar un potencial de placa lo suficientemente amplio que pueda desencadenar un potencial de acción muscular, esto conlleva que determinadas unidades se vean “bloqueadas” y que la sumatoria del potencial de acción muscular compuesto vaya siendo cada vez menor³² (Figura 1)



Modelo animal

Aunque existen diferentes modelos animales de la MG, probablemente el más desarrollado y conocido es el que se realiza en ratones³³. A manera de resumen podemos decir que la enfermedad se induce en el ratón administrándole un concentrado purificado de RACH de otra especie por vía subcutánea en repetidas ocasiones y generalmente con potenciadores como el adyuvante de Freund con la finalidad de producir una respuesta autoinmune cruzada contra los RACH propios del ratón. Unas semanas (4 en promedio) tras la administración del RACH el animal desarrolla el cuadro clínico típico de la enfermedad presentando debilidad muscular, disminución de la ingesta por incapacidad para deglutir y menor movilidad; existen escalas para determinar clínicamente el grado de afectación del animal enfermo, además también se puede demostrar en el modelo otras características de la enfermedad como el bloqueo neuromuscular evidenciado por electromiografía, la presencia de autoanticuerpos contra el RACH y la mejoría clínica tras la administración de inhibidores de la acetilcolinesterasa. La fuente de RACH utilizada en este modelo es un concentrado purificado obtenido a partir del órgano eléctrico de la raya eléctrica (*Torpedo californica*). Precisamente la obtención de este compuesto es una limitante importante y no existe una forma comercial del mismo disponible, por esto se han implementado con éxito³⁴ otras aproximaciones en las que el RACH se obtiene por técnicas de ADN recombinante del gen de la subunidad α del RACH, esta metodología es más económica y práctica y permite obtener una fuente abundante del antígeno para desarrollar el modelo. El uso de estos modelos ha llevado a desentrañar múltiples aspectos patogénicos y terapéuticos de la MG^{19,35,36}.

Características clínicas

Como ya hemos mencionado, la característica fundamental de la MG es la debilidad muscular que generalmente es fluctuante y típicamente aumenta en la medida en la que se incrementa la actividad muscular, lo que se conoce como fatigabilidad. La MG sólo afecta a los músculos estriados, por lo que no debe haber síntomas referidos al músculo liso o cardíaco, a diferencia de otras entidades como el síndrome de Eaton-Lambert, que al ser producto de una alteración presináptica de la unión neuromuscular produce también clínica disautonómica (alteraciones pupilares, xerostomía, xeroftalmia, síntomas digestivos)³⁷. La debilidad afectará más a aquellos músculos que de forma tónica permanecen más activos, por lo que la gran mayoría de los casos afecta a los músculos oculares extrínsecos y al elevador del párpado superior, produciendo oftalmoplejia u oftalmoparesia y ptosis palpebral. Kuks³⁸ realiza una descripción de sus 805 casos de pacientes con MG recogidos a lo largo de 34 años; en su serie el 50% de los pacientes tuvo un inicio exclusivamente ocular, de esos el 42,5% sólo manifestó diplopia, el 26% sólo ptosis palpebral y el 31,3% la combinación de ambas; la segunda forma de inicio más frecuente fue la combinación de clínica ocular y bulbar (8,9%) y en tercer lugar la clínica bulbar (7,3%); otras formas de inicio como la disartria aislada o debilidad de las extremidades sin afectación oculobulbar fueron muy infrecuentes. La progresión de la debilidad se suele producir en sentido craneocaudal, las tasas de desarrollo de una miastenia generalizada tras un inicio ocular son variables, tan bajas como 7,7%³⁹ o tan altas como 74%⁴⁰, lo que sí está claro es que la mayor parte de los pacientes que desarrollarán clínica generalizada lo harán en los primeros 24 meses desde el inicio de los síntomas oculares y que los factores que predicen la generalización son la presencia de antiRACH, alteraciones tímicas y alteraciones en los estudios neurofisiológicos, sin

que se haya podido demostrar que iniciar cualquiera de los tratamientos disponibles vaya a evitar la progresión de una MG ocular a una MG generalizada⁴¹.

La debilidad muscular en la MG generalmente es asimétrica, puede haber debilidad en reposo pero siempre empeorará con la actividad muscular (Figura 2). Para evocar la fatigabilidad se le debe pedir al paciente que realice movimientos repetitivos, como pueden ser flexiones cervicales o abducciones de los miembros superiores, o mantener



Figura 2. Debilidad palpebral en un paciente con MG

Fotos de un paciente con miastenia gravis. A: En reposo tiene ptosis palpebral derecha. B: Tras la supravversión mantenida durante 30 segundos se aprecia el empeoramiento de la ptosis palpebral derecha y la aparición de ptosis del lado izquierdo.

posturas tónicas de las extremidades durante periodos determinados de tiempo, p. ej. mantener la mirada hacia arriba y un lado durante 60 segundos, extender los brazos durante 240 segundos o flexionar la cadera a 45º durante 100 segundos³⁸. Se puede pedir al paciente que cuente del 100 al 200 para evocar la disartria fatigable. Otra maniobra muy útil para el diagnóstico de la enfermedad es el “test del hielo” que consiste en aplicar frío local sobre el párpado para evidenciar cómo mejora la ptosis, ya que el frío mejora la transmisión neuromuscular al disminuir la actividad de la acetilcolinesterasa. En casos avanzados se puede apreciar atrofia muscular aunque es un hallazgo infrecuente en la MG por antiRACH, sí que es típico de la MG asociada a anticuerpos antiMuSK^{18,38,42}. Los reflejos de estiramiento muscular generalmente son normales al igual que la coordinación de los movimientos. No debe haber síntomas sensitivos ni datos de afectación del sistema nervioso central.

La evolución de la enfermedad es muy variable, pacientes en tratamiento y situación clínica estables pueden deteriorarse funcionalmente y sufrir una reagudización de la enfermedad que puede estar relacionada con determinados factores como infecciones, uso de fármacos que empeoran la transmisión neuromuscular, cirugías, embarazo o parto, exposición a temperaturas extremas o durante el curso de la titulación descendente del tratamiento inmunosupresor. El riesgo de tener una crisis miasténica, definida como el deterioro de la función respiratoria que requiere asistencia ventilatoria, es de un 15 a 20% a lo largo de la vida de estos pacientes⁴³, en estas circunstancias los pacientes requieren una rápida atención y el umbral para el ingreso en una unidad de cuidados intensivos debe ser bajo²⁰. Antes del desarrollo y la aplicación de los tratamientos inmunosupresores actuales, la mortalidad por la enfermedad rondaba el 50 al 80% (de ahí el adjetivo de gravis) pero actualmente la letalidad de la enfermedad ronda el 3% en general y el 5% en el caso de la crisis miasténica⁴⁴.

Un 10% de los casos de MG están asociados a timoma y alrededor del 50% de los pacientes con timoma desarrollan una MG^{20,45}. Además, se pueden presentar con otros síndromes paraneoplásicos, muchos de ellos neurológicos (opsoclonus-mioclonus, síndrome de Isaac, síndrome de Morvan). Estos tumores derivan de las células epiteliales del timo y son histológicamente heterogéneos, son capaces de producir linfocitos T CD4 y CD8 maduros que pasan a la circulación periférica y que pueden participar en la patogenia de la MG. El tratamiento más conveniente del timoma es la resección y generalmente se asocian tratamientos quimioterápicos y radioterapia local dependiendo del tipo histológico y el grado de invasión así como de la extensión de la resección quirúrgica⁴⁶. La supervivencia a 10 años de estos pacientes, dependiendo del tipo histológico y de la extensión de la resección varía del 40 al 80%⁴⁷

Exploraciones complementarias

En la MG se debe realizar el análisis de autoanticuerpos propios de la enfermedad, los antiRACH tiene una sensibilidad del 85% en los casos generalizados pero en la MG ocular pueden ser positivos sólo en un 50% de los casos. La presencia de estos anticuerpos puede tener implicaciones terapéuticas como veremos más adelante pero no tienen utilidad para seguir la evolución de la enfermedad, por lo que carece de sentido repetirlos de forma seriada. En cuadros generalizados con antiRACH negativos conviene analizar los anticuerpos antiMuSK y antiLRP4. El estudio neurofisiológico puede confirmar el trastorno de la transmisión neuromuscular, las pruebas neurofisiológicas generalmente realizadas son la estimulación nerviosa repetitiva (descrita anteriormente) o la electromiografía de fibra única también conocida como *jitter*, que consiste en realizar estímulos eléctricos repetitivos y evidenciar la variabilidad de las latencias de las respuestas motoras, en la MG esta variabilidad (o *jitter*) puede estar aumentada. El *jitter* tiene una sensibilidad mayor que la estimulación nerviosa repetitiva ya que aproximadamente un 94% de los casos generalizados y un 80% de los casos oculares, presentarán una alteración de esta prueba⁴⁸. El test del edrofonio, que consiste en administrar, por vía intravenosa, este medicamento inhibidor de vida media corta de la acetilcolinesterasa. Esta prueba puede revertir rápidamente la debilidad miasténica y ayudar al diagnóstico en casos dudosos, pero no es indispensable realizarlo de forma rutinaria. Sí que resulta imprescindible realizar a todos los pacientes con MG un estudio de imagen del tórax con la finalidad de detectar la presencia de un timoma o de otras alteraciones del timo. Aunque generalmente se prefiere la tomografía computarizada también puede usarse la resonancia magnética torácica puesto que ambas pruebas son similares en cuanto a sensibilidad (que ronda el 90% para ambas) si

bien la resonancia pueda ser algo más precisa para definir el tipo de lesión tímica^{49,50}.

Cabe destacar que el diagnóstico de esta enfermedad es fundamentalmente clínico y que las pruebas no están destinadas a confirmar o descartar el mismo.

Tratamiento

El tratamiento médico de la miastenia gravis tiene tres pilares fundamentales, el tratamiento sintomático, la inmunosupresión y la timentomía. El tratamiento sintomático se realiza con medicamentos inhibidores de la acetilcolinesterasa con la finalidad de aumentar la disponibilidad de ACh en la unión neuromuscular, el más usado en nuestro medio es el bromuro de piridostigmina (Mestinón®), se administra por vía oral con un promedio de 180 mg al día, aunque si el paciente lo tolera y lo requiere se puede aumentar la dosis; es frecuente que produzca efectos secundarios de índole colinérgica como bradicardia, hipotensión, calambres musculares, diarrea, cólicos abdominales, epifora, hiperhidrosis, entre muchos otros, incluso puede producir empeoramiento de la debilidad muscular en el caso de crisis colinérgicas graves aunque este efecto es mucho menos frecuente. Generalmente es utilizado como tratamiento de inicio en caso de síntomas leves y si no resulta eficaz para el control sintomático en un corto plazo se iniciará el tratamiento inmunosupresor.

En nuestro centro, el tratamiento de los pacientes con MG lo realizamos siguiendo las recomendaciones de la guía de consenso internacional realizada por el grupo de trabajo de la MGFA (del inglés *Myasthenia Gravis Foundation Association*)⁵¹ cuyos preceptos resumimos a continuación:

- El objetivo del tratamiento en la MG es que el paciente no tenga síntomas ni afectación funcional en sus actividades diarias producto de la enfermedad

(aunque al explorarlos pueda evidenciarse debilidad leve en algunos músculos).

No debe haber efectos secundarios relevantes del tratamiento.

- El tratamiento inmunosupresor de primera elección son los corticoides (generalmente prednisona) por su rápida acción sobre la enfermedad que generalmente comienza a controlar los síntomas en las primeras dos semanas de tratamiento. La dosis se debe ajustar hasta lograr el objetivo de tratamiento y posteriormente iniciar una lenta titulación descendente.
- En caso de que los corticoides estén contraindicados, produzcan efectos secundarios intolerables, sean ineficaces o no se pueda disminuir la dosis por recaída sintomática, se indica un segundo inmunosupresor.
- Como inmunosupresor adicional de primera línea indicamos azatioprina. Si está contraindicada, no se tolera o es ineficaz se puede indicar micofenolato de mofetilo, ciclosporina, tacrolimus o metotrexate.
- En casos refractarios (ineficacia o empeoramiento tras tratamiento con corticoides y al menos 2 ensayos con otros inmunosupresores no esteroideos durante un tiempo adecuado, presencia de efectos secundarios intolerables o inaceptables del tratamiento) se puede indicar plasmaféresis o inmunoglobulinas intravenosas crónicas (pautadas generalmente 1 vez al mes), rituximab o ciclofosfamida.
- En caso de crisis miasténica, el paciente ingresa en UCI y se indica plasmaféresis o inmunoglobulinas intravenosas.
- En ausencia de timoma, se recomienda timectomía en casos de pacientes menores de 65 años con MG generalizada, con antiRACH positivos y que no respondan correctamente al tratamiento inmunosupresor. Este tratamiento, a

pesar de usarse de forma relativamente empírica desde hace muchos años, evidenció su efecto para mejorar la clínica y disminuir los requerimientos de inmunosupresores de los pacientes en un ensayo clínico internacional aleatorizado publicado recientemente⁵².

- Salvo circunstancia excepcionales (edad muy avanzada, comorbilidad, rechazo del paciente a la cirugía), todos los pacientes con timoma deben ser intervenidos para la resección del tumor y seguir el tratamiento oncológico correspondiente.

Conviene reseñar aquí que recientemente se ensayó un nuevo fármaco para el tratamiento de la MG, eculizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido al componente C5 del complemento y capaz de inhibir la activación de este que se estudió en un ensayo clínico⁵³ frente a placebo en pacientes con al menos dos tratamientos inmunosupresores y que persistieran con clínica de la enfermedad, y actualmente está aprobado por la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento de la MG generalizada refractaria.

Los receptores tipo Toll (*Toll-Like Receptors*, TLR)

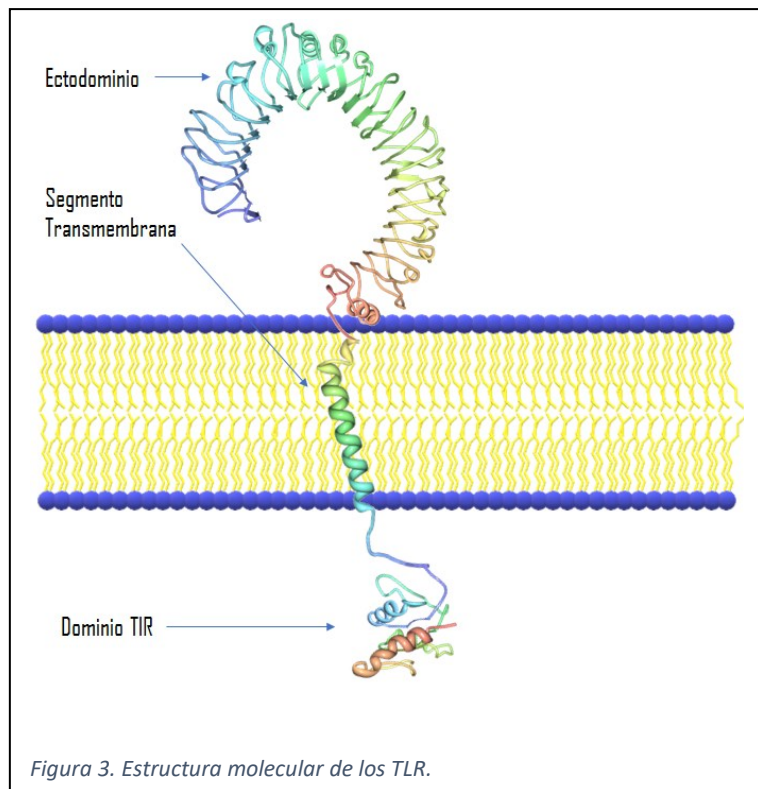
Tradicionalmente el sistema inmunitario se ha clasificado en dos grandes grupos, el innato y el adaptativo. El sistema inmunitario innato responde de forma inespecífica ante diversos microorganismos y moléculas que señalan lesiones tisulares endógenas y es el principal responsable de la respuesta inflamatoria ante los agentes reconocidos como no propios, como son los microorganismos, o potencialmente nocivos como las células dañadas. Charles Janeway predijo que deberían existir receptores que identificasen patrones (*Patter-recognition receptors*, PRR) moleculares asociados a

microorganismos patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) o asociados al daño tisular (*danger-associated molecular patterns*, DAMP) y que estos PRR serían el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa.

En 1985 Christian Nüsslein-Volhard⁵⁴ encontró que las mutaciones de un gen de *Drosophyla melanogaster* causaban que sus larvas tuviesen la porción ventral poco desarrollada y denominó a ese gen *Toll* (del alemán formidable, extravagante) por la forma tan extraña que adoptaban esas larvas; su descubrimiento la llevaría a obtener el premio Nobel en 1995. En 1996 Jules Hoffman y su grupo de investigación publican sus investigaciones⁵⁵ en las que demostraron que las moscas con mutaciones del gen Toll perdían la capacidad de responder a infecciones fúngicas concluyendo que este gen estaría relacionado con la respuesta inmunitaria. Por este trabajo Hoffman también recibió un premio Nobel en 2011 junto a Bruce Beutler que clonó el gen del receptor TLR4 que posteriormente sería identificado como el receptor del lipopolisacárido (LPS) de la pared bacteriana⁵⁶. Desde los trabajos de Nüsslein-Volhard se han descrito en humanos 10 TLR (13 en ratones) que conforman una familia de moléculas relacionadas principalmente con la detección de forma inespecífica por parte del sistema inmunitario de diferentes moléculas microbianas (PAMP) y derivadas del daño tisular (DAMP) y están implicados en la activación del sistema inmunitario innato activando las respuestas inflamatorias y antivirales con la finalidad de erradicar los microorganismos.

Estructura, activación y señalización

Estructuralmente estos receptores pertenecen a la clasificación topológica de receptores transmembrana tipo I, su porción extracelular tiene un dominio rico en repeticiones de leucina y la porción intracelular un dominio homólogo al receptor de la IL-1



(dominio TIR, *Toll/IL-1 receptor domain*)⁵⁷ y su morfología se asemeja a la de un gancho o un signo de interrogación (Figura 3) De los 10 TLR, los tipos 3, 7, 8 y 9 son intracelulares y el resto se localizan en la superficie celular. El presente trabajo está enfocado en los TLR de superficie (1, 2, 4, 5, 6 y 10) cuya expresión se ha descrito en los diversos linajes celulares del sistema inmunitario, a saber: neutrófilos⁵⁸⁻⁶⁰, monocitos⁶¹⁻⁶³, linfocitos B⁶⁴⁻⁶⁶, linfocitos T CD4+ (LTCD4)⁶⁷⁻⁷¹, linfocitos T CD8+ (LTCD8)^{67-69,72}, células NK⁷³⁻⁷⁵ y células dendríticas⁷⁶⁻⁷⁸. Hay que destacar también que diversos TLR se expresan en múltiples tipos celulares que no pertenecen al sistema inmunitario como astrocitos, hepatocitos, células epiteliales de la vía aérea, queratinocitos, células neuroendocrinas y epiteliales del estómago y el intestino, en los túbulos renales, el endotelio vascular y el músculo liso vascular, entre otros⁶².

Bryant et al⁷⁹ han revisado *in extenso* los mecanismos de activación de los TLR que resumiremos brevemente. Cada TLR tiene como ligandos grupos determinados de moléculas (Tabla 1) que como se puede apreciar en la tabla son molecularmente heterogéneos y cubren ampliamente los grandes grupos estructurales de las biomoléculas de la naturaleza, desde moléculas pequeñas como el ácido úrico, pasando por polisacáridos, complejos de lípidos y polisacáridos como el lipopolisacárido (LPS), proteínas como la flagelina, hasta llegar a estructuras complejísimas como la LDL oxidada o el ADN. Esto permite que el sistema inmunitario tenga la capacidad de detectar la presencia de virus, bacterias, hongos y parásitos; adicionalmente estos receptores también son capaces de detectar la presencia de lesiones tisulares del propio organismo al unirse a moléculas como las proteínas de choque térmico (hsp), las defensinas y la proteína HMGB-1 (High mobility group box 1), una proteína presente en

Tabla 1. Ligandos endógenos y exógenos de los TLR humanos

TLR	Ligandos exógenos (PAMP)	Ligandos Endógenos (DAMP)
TLR1	Lipoproteína (bacterias Gram positivas)	
TLR2	Ácido lipoteicoico y lipoproteínas (bacterias Gram +), cimosano y β glicano (hongos), anclajes GPI (protozoarios)	beta-amiloide, fibronectina, hsp60, ácido hialurónico, LDL oxidada, ácido úrico
TLR3	dsRNA (viral)	mRNA
TLR4	Lipopolisacáridos (bacterias Gram negativas)	α y β defensinas, HMGB1, hsp60, LDL oxidada
TLR5	Flagelina (bacterias flageladas)	
TLR6	Lipoproteína (bacterias Gram positivas)	
TLR7	ssARN (virus)	ssARN
TLR8	ssARNA (virus)	ssARN
TLR9	ADN (bacterias, virus, hongos)	ADN mitocondrial
TLR10	Desconocidos	

el núcleo celular, implicada en la transcripción y que también funciona como un potente desencadenante de la respuesta inflamatoria.

Para activarse, todos los TLR, deben formar dímeros, estos dímeros pueden incluso ser combinaciones de distintos TLR como los heterodímeros TLR2/TLR6 o TLR2/TLR1; una vez que el ligando se une al receptor se induce un cambio conformacional que facilita la formación del dímero correspondiente, que también debe estar unido al ligando, pudiendo ser la misma molécula (por ejemplo, una cadena de ARN bicatenario) o dos moléculas separadas del mismo ligando (p. ej. una molécula de LPS por cada TLR4). Resulta interesante que en el caso de TLR4, el LPS primero debe unirse a una proteína sérica (antígeno linfocitario 96 o MD-2) que funciona como un acoplador intermediario entre el receptor y el ligando, es decir, que para activarse TLR4 debe formar un complejo heterotetramérico (Figura 4)

Una vez que se forma el dímero de TLR, los dominios TIR intracelulares de cada receptor se acercan y se activan, posteriormente se desencadena una cascada de reacciones de fosforilación intracelular a través de dos vías: la dependiente de MyD88 la vía dependiente de TRIF. Todos los TLR excepto TLR3 actúan por la vía MyD88 pero sólo TLR3 y TLR4 actúan por la vía TRIF y ambas vías conducen al aumento de la transcripción (mediado por NF- κ B) de los genes de diversas citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12) o (mediado por IRF [del inglés Interferon Regulatory Factor]) de interferones tipo I⁸⁰ (Figura 5).

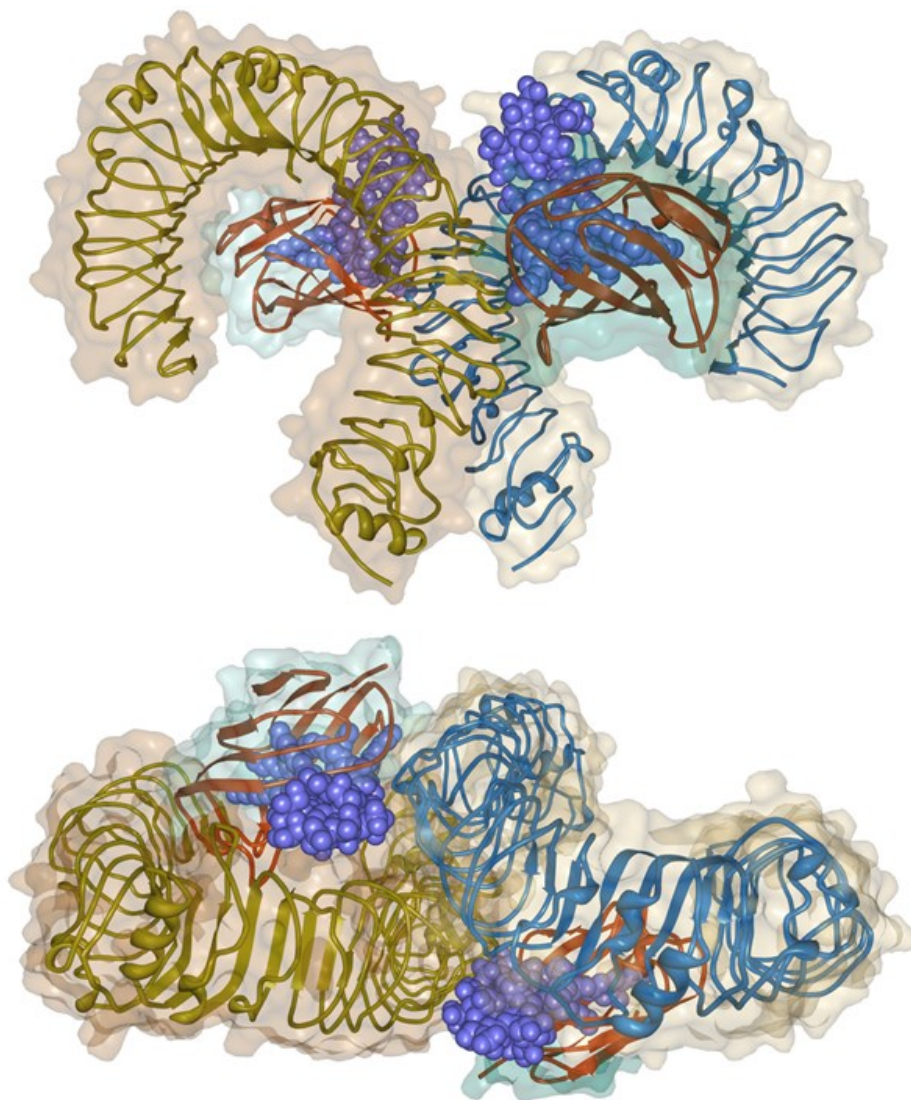


Figura 4. Para su activación, los TLR deben formar dímeros.

En este caso representamos el ejemplo de TLR4, en modelo de cintas los monómeros de TLR4 (ocre y azul), la proteína sérica MD-2 (en rojo) y en modelo "spacefill" en púrpura sendas moléculas de LPS. Arriba plano frontal, abajo plano superior. Es fácil apreciar cómo los complejos LPS-MD2 permiten que se forme el dímero de TLR4.

Figura 5. Cascada de señalización intracelular de los TLR

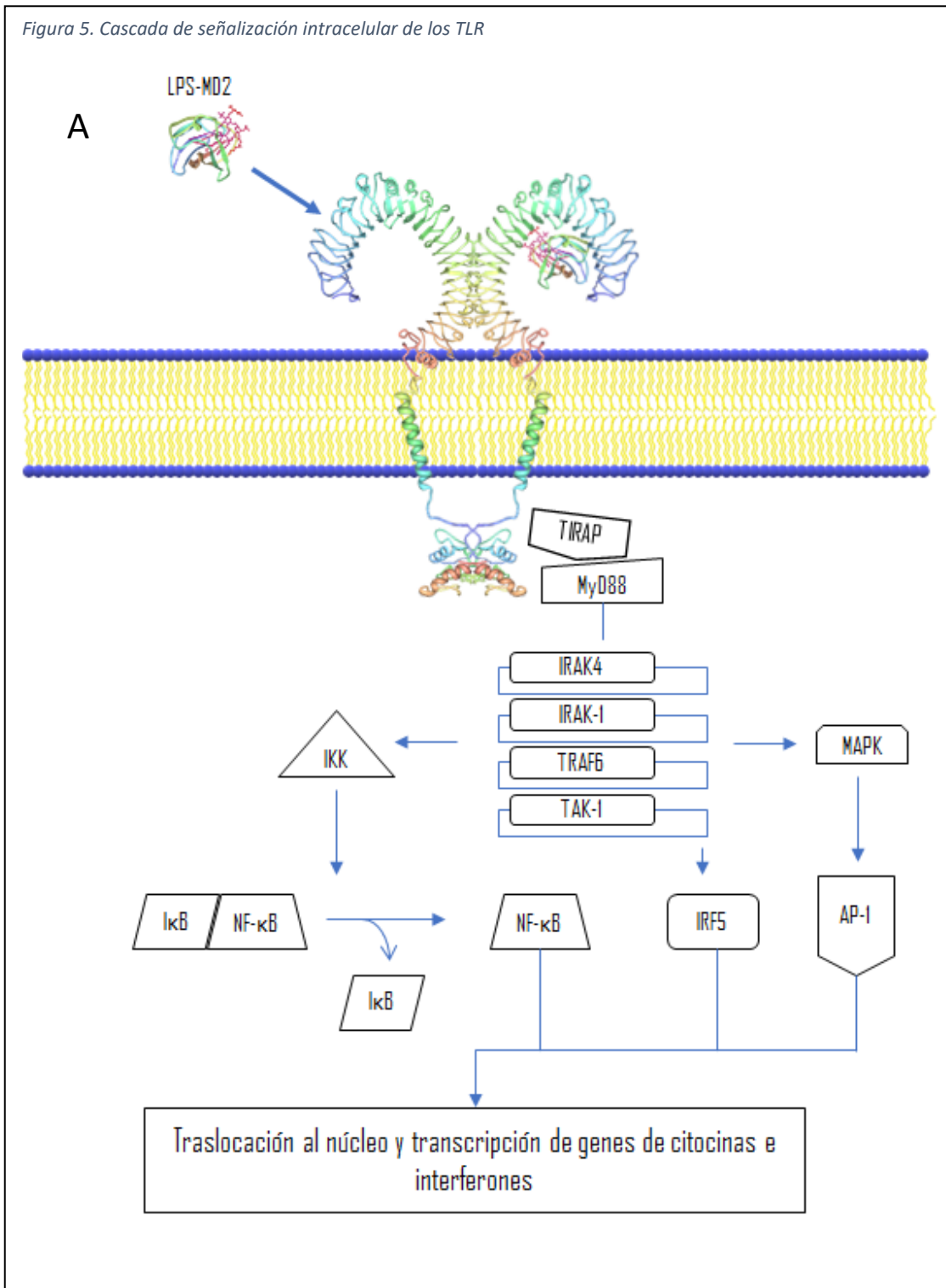
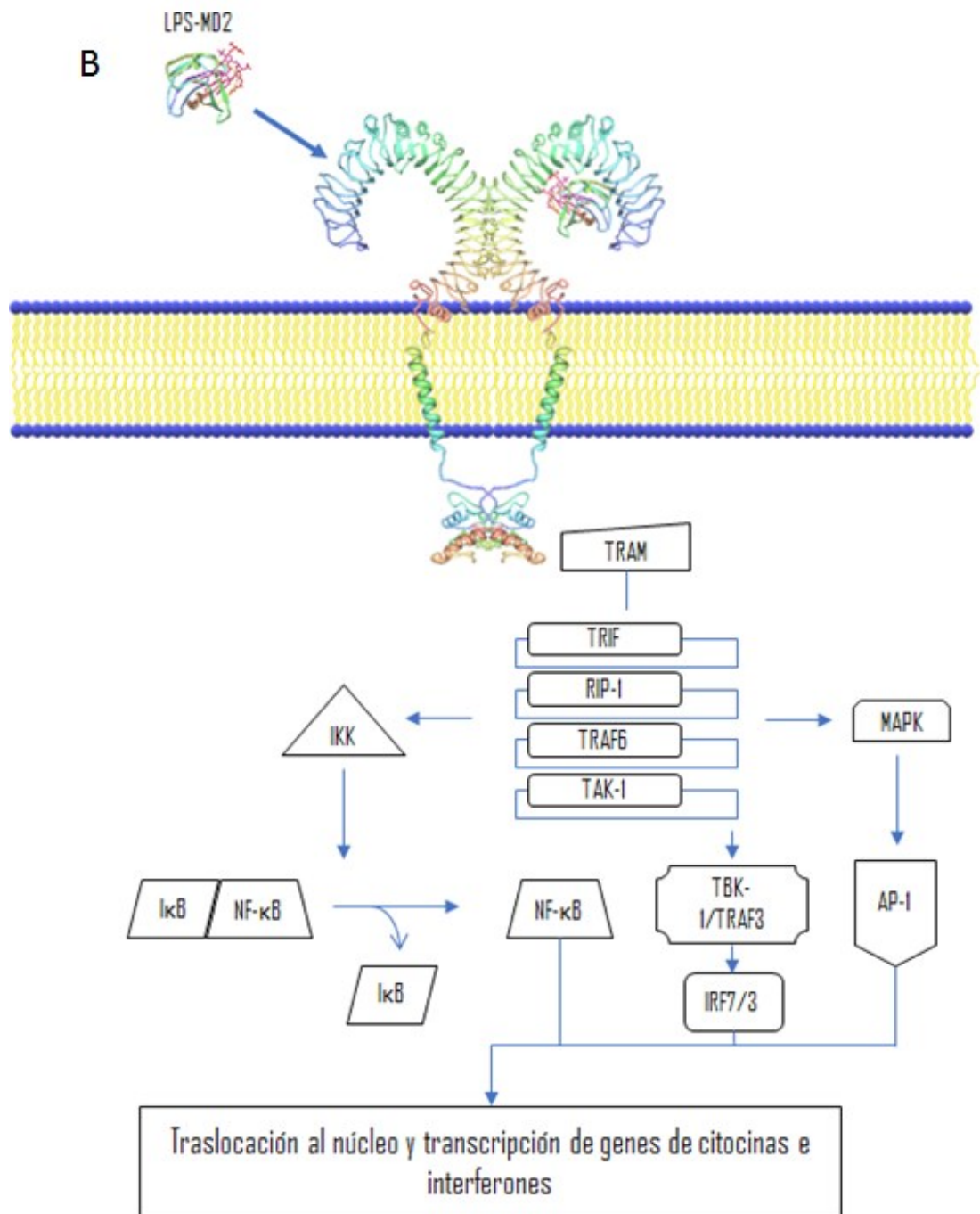


Figura 5. Continuación



Representación esquemática de las vías de señalización intracelular que se desencadenan tras la activación de los TLR por la unión a su ligando (se representa como ejemplo TLR4 que puede activar ambas vías). A: Vía MyD88, la conformación del dímero de TLR4 permite reclutar a MyD88, la activación de TAK-1 está mediada por el complejo IRAK4, IRAK-1 y TRAF6 (por fosforilación secuencial), TAK-1 permite la traslocación de NF-κB y AP-1 al núcleo lo que finalmente conlleva a la transcripción de genes de citocinas e interferones. La traslocación de IRF5 puede ser independiente de TAK-1. B: Vía TRIF, la conformación del dímero de TLR4 permite reclutar a TRIF, la interacción de esta con RIP-1, y TRAF6 permite la traslocación de NF-κB y AP-1 de forma similar a la vía MyD88, TRIF puede activar de forma independiente a TBK-1 y TRAF3 y desencadenar la traslocación de IRF7 y 3 al núcleo. Todos estos factores una vez en el núcleo permiten la transcripción de genes de citocinas e interferones. Nota: En aras de la claridad se han omitido algunos pasos intermedios.

Los TLR y su relación con la autoinmunidad y la miastenia gravis

Para que se desarrolle una enfermedad autoinmune es necesario que existan células autorreactivas que se generan debido al fallo de los mecanismos de tolerancia, esta pérdida de la tolerancia debe producirse durante la diferenciación central y periférica para que las células B y T pierdan el control de su activación. Los TLR son un enlace entre la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa por lo que se ha propuesto que su activación puede contribuir al desarrollo de las enfermedades autoinmunes.

Los TLR están implicados parcialmente en el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes, por ejemplo, en la artritis reumatoide existe una sobreexpresión de TLR3, 7 y 9 en macrófagos y células dendríticas, en comparación con individuos sanos, en la esclerosis sistémica se ha encontrado una mayor concentración sérica de la proteína HMGB-1 que es un agonista endógeno de TLR4 que conlleva a un aumento de TGF- β lo que induce la activación de los fibroblastos, en la enfermedad de Behçet hay un aumento de la expresión del mRNA de TLR4 en PBMC y en la esclerosis múltiple se ha evidenciado un aumento de la expresión de TLR2 y 4 en PBMC⁸¹. Sin embargo, estas alteraciones no necesariamente se han correlacionado con la actividad o la génesis de estas enfermedades en un modelo inmunopatogénico explicativo.

En la MG específicamente existen algunos estudios que reflejan que podría existir un papel de los TLR en el desarrollo o el mantenimiento de la situación de autoinmunidad que caracteriza a esta enfermedad. Wang et al⁸² estudiaron a 62 pacientes con MG, realizaron un análisis de la expresión de mRNA de los TLR en PBMC por medio de RT-Q-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa) y

encontraron que los niveles de mRNA de TLR2, 3, 4, 5, 8 y 9 estaban aumentados en comparación con los controles sanos y que los niveles de mRNA de TLR9 se correlacionaban positivamente con la gravedad del paciente, destaca también de su estudio que la expresión de TLR no varió tras la administración de corticoides. Estos resultados evidencian que existe una expresión diferente de TLR en pacientes con MG. Sin embargo, puesto que estudian las PBMC en su conjunto, no nos permiten saber qué células son las que tienen una expresión diferente y además no estudian la expresión proteica por lo que no podemos deducir que efectivamente estos receptores estén teniendo una participación directa en la génesis de la enfermedad.

La mayor parte de la literatura respecto a la relación entre TLR y MG se enfoca en el estudio de la expresión de estos receptores en el timo donde se ha evidenciado un aumento de los niveles de mRNA de TLR4 en las células epiteliales del timo en pacientes con MG y timitis en comparación con aquellos pacientes con hiperplasia tímica o timoma, lo que favorecería la hipótesis de que una señal de peligro externa podría activar al sistema inmunitario y contribuir con el desarrollo del proceso autoinmune⁸³. Posteriormente, el mismo grupo demostró que la estimulación de las células epiteliales tímicas (que sobreexpresan TLR4) al ser estimuladas aumentan su expresión de CCL17 y CCL22 e induce la producción de citocinas Th17, lo que conllevaría a un mayor reclutamiento de células dendríticas hacia el timo y comprometería la función de las células T reguladoras⁸⁴. En otro trabajo se describió que los niveles de mRNA de TLR7 y 9 estaban aumentados en los linfocitos B y células plasmáticas de los centros germinales tímicos de pacientes con MG e infección previa por el virus de Epstein-Barr, en comparación con aquellos pacientes que no habían sufrido dicha infección, lo que según sus autores sugiere que la activación de estos receptores secundaria a la infección

viral conlleva a la generación de un ambiente proinflamatorio de larga duración en el timo que podría desencadenar la respuesta autoinmune⁸⁵. No encontramos ningún trabajo que estudiase la expresión proteica de TLR en células circulantes del sistema inmunitario de pacientes con MG.

TLR y terapéutica

Teniendo en cuenta que los TLR regulan la respuesta inmunológica se ha planteado su modulación con inhibidores para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o donde la respuesta inflamatoria exagerada puede ser dañina como la sepsis y con agonistas en situaciones en las que se requiere un aumento de la actividad inmunológica como puede ser el caso del cáncer, incluso en el ámbito preventivo donde activar estos receptores podría favorecer la respuesta ante vacunas.

El ejemplo mejor conocido es el del imiquimod, un agonista de TLR7 que se usa de forma tópica para el tratamiento del carcinoma basocelular donde actúa estimulando la inmunidad celular antitumoral de monocitos/macrófagos y células dendríticas aumentando la producción de interferón alfa⁸⁶. En un ensayo clínico (fase IIb) se probó el efecto de un antagonista de TLR9, cobitolimod, aplicado localmente por medio de una colonoscopia en el intestino de pacientes con colitis ulcerosa y el tratamiento se asoció con una mayor frecuencia de remisión clínica en comparación con placebo, sin una mayor frecuencia de efectos secundarios⁸⁷. Se ha ensayado también (Fase I/II) un agonista de TLR7 (852A) en pacientes con leucemia linfática crónica sin encontrar beneficio clínico pero sin efectos secundarios relevantes⁸⁸. También se han desarrollado antagonistas de TLR4 a partir de aptámeros con buenos resultados en modelos

experimentales de infarto cerebral (isquemia-reperfusión) donde han demostrado reducir el volumen de infarto en los animales tratados⁸⁹.

Justificación del Proyecto

En este trabajo nos planteamos cuantificar la expresión de los TLR como una medida indirecta del papel que distintas células del sistema inmunitario innato y adaptativo podrían estar jugando en el desarrollo o la cronificación de la MG. La expresión proteica de estos receptores en las células circulantes del sistema inmunitario de pacientes con MG no ha sido estudiada previamente y, por tanto, con este trabajo pretendemos ampliar la base de conocimiento sobre la etiopatogenia de esta enfermedad, lo que podría acrecentar el campo de búsqueda de dianas terapéuticas específicas para los casos (no tan infrecuentes) en los que los tratamientos de primera línea resultan ineficaces.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

- La expresión de receptores TLR de superficie en leucocitos circulantes es diferente en pacientes con miastenia gravis en comparación con controles sanos.

OBJETIVOS

Objetivo principal

- Analizar, mediante citometría de flujo, la expresión proteica de los receptores TLR de superficie en leucocitos circulantes de pacientes con miastenia gravis en comparación con individuos sanos.

Objetivos secundarios

- Correlacionar la expresión de los receptores TLR de superficie en leucocitos circulantes en pacientes con miastenia gravis generalizada con:
 - Gravedad de la enfermedad
 - Niveles séricos de anticuerpos antiRACH
 - Tratamiento inmunosupresor actual
 - Presencia o antecedente de timoma

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio, pacientes y controles

El presente es un estudio observacional, analítico, unicéntrico, con inclusión prospectiva de pacientes, cuyo objetivo fue determinar la expresión de los receptores TLR en los leucocitos circulantes en pacientes con MG generalizada para compararlos con sujetos sanos. Los pacientes que se reclutaron estaban en seguimiento en la consulta monográfica de enfermedades neuromusculares del Servicio de Neurología del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid cuyo responsable es el autor de esta tesis.

Para participar en el estudio los pacientes debían cumplir los siguientes criterios de inclusión:

- Diagnóstico de miastenia gravis generalizada basado en la presencia de clínica típica de la enfermedad, resultados positivos de anticuerpos antiRACH (> 0,45 nmol/L) y al menos una de las siguientes características:
 - Alteraciones neurofisiológicas compatibles con un trastorno postsináptico de la transmisión neuromuscular:
 - Decremento patológico en la estimulación nerviosa repetitiva o
 - Alteración del jitter en el estudio de fibra aislada con un MCD > 25).
 - Respuesta a tratamiento con anticolinesterásicos
- Mayor de 18 años.
- Firma de consentimiento informado

Excluimos aquellos pacientes que tuvieran otra enfermedad inmunológica, inflamatoria o infecciosa activa que pudiera interferir en los resultados del análisis.

De cada caso se recogieron variables demográficas, clínicas y terapéuticas que se almacenaron de forma anonimizada en una base de datos. La situación clínica se midió por las escalas MG-Composite⁹⁰ (Tabla 2) cuyo valor fue medido y registrado el día de la inclusión en el estudio y de la extracción de la muestra y la escala MGFA⁹¹ (Tabla 3) de la que se registró la clase en el día de la inclusión y también se recogió su valor máximo desde el inicio de la enfermedad según constase en la historia clínica del paciente.

Los controles fueron sujetos sanos donantes de sangre que acudían voluntariamente al Banco de Sangre del Hospital Universitario de La Princesa, debían ser personas mayores de 18 años y que no tuvieran enfermedades inmunológicas, inflamatorias o infecciosas activas, los sujetos de control también debían firmar un consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio.

El estudio contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de La Princesa (Nº de Registro: PI-799). El estudio se financió con fondos propios para investigación del Servicio de Neurología del Hospital Universitario de La Princesa.

Tabla 2. Escala MG-Composite

Característica	Puntuación			
	>45 segundos = 0	11-45 segundos = 1	1-10 segundos = 2	Inmediata = 3
Ptosis	>45 segundos = 0	11-45 segundos = 1	1-10 segundos = 2	Inmediata = 3
Diplopia con la mirada lateral	>45 segundos = 0	11-45 segundos = 1	1-10 segundos = 2	Inmediata = 4
Cierre palpebral	Normal = 0	Debilidad leve (puede abrirse con esfuerzo) = 0	Debilidad moderada (se puede vencer con facilidad) = 1	Debilidad grave (incapaz de mantener el ojo cerrado = 2)
Lenguaje	Normal = 0	Disartria o disfonía intermitente = 2	Disartria o disfonía constantes pero inteligible = 4	Lenguaje difícil de entender = 6
Masticación	Normal = 0	Fatiga con alimentos sólidos = 2	Fatiga con alimentos blandos = 4	Sonda nasogástrica = 6
Deglución	Normal = 0	Atragantamientos o problemas para tragar infrecuentes = 2	Problemas de deglución frecuentes = 5	Sonda nasogástrica = 6
Respiración	Normal = 0	Disnea de esfuerzo = 2	Disnea en reposo = 4	Ventilación mecánica = 9
Flexión o extensión del cuello	Normal = 0	Debilidad Leve = 1	Debilidad Moderada = 2	Debilidad Grave = 4
Abducción del hombro	Normal = 0	Debilidad Leve = 1	Debilidad Moderada = 2	Debilidad Grave = 4
Flexión de la cadera	Normal = 0	Debilidad Leve = 1	Debilidad Moderada = 2	Debilidad Grave = 4

Tabla 3. Escala MGFA

Clase	Características
Clase I	Debilidad de la musculatura ocular, puede haber debilidad del cierre palpebral. El resto de la fuerza muscular es normal
Clase II	Debilidad leve que afecta a otros músculos diferentes a los oculares. También puede haber debilidad de la musculatura ocular de cualquier gravedad
IIa	Predominio de afectación de músculo de extremidades, axiales o ambos
IIb	Predominio de afectación de músculos orofaríngeos, respiratorios o ambos
Clase III	Debilidad moderada que afecta a otros músculos diferentes a los oculares. También puede haber debilidad de la musculatura ocular de cualquier gravedad
IIIa	Predominio de afectación de músculo de extremidades, axiales o ambos
IIIb	Predominio de afectación de músculos orofaríngeos, respiratorios o ambos
Clase IV	Debilidad grave que afecta a otros músculos diferentes a los oculares. También puede haber debilidad de la musculatura ocular de cualquier gravedad
IVa	Predominio de afectación de músculo de extremidades, axiales o ambos
IVb	Predominio de afectación de músculos orofaríngeos, respiratorios o ambos. Necesidad de colocación de sonda nasogástrica
Clase V	Intubación con o sin ventilación mecánica

Análisis de expresión de TLR

De cada sujeto se obtuvieron 10 mL de sangre heparinizada, el mismo día de la extracción se llevó a cabo una inmunofluorescencia directa con los siguientes anticuerpos fluorescentes:

- CD14 PerCP-Cy5 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)
- CD16/CD56 APC-H7 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)
- CD3 VioBlue (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)
- CD4 VIT-4 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)
- CD19PE-Cy7 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania)
- TLR2-FITC (T2.5, Biolegend, San Diego, CA, USA)
- TLR6-PE (TLR6.127, Biolegend, San Diego, CA, USA)
- TLR10-PE (3C10C5, Biolegend, San Diego, CA, USA)
- TLR1-APC (TLR1, R&D System, Minneapolis, MN, USA),
- TLR4-FLUORESCHEIN (610015, R&D System, Minneapolis, MN, USA)
- TLR5-FITC (TLR5, R&D System, Minneapolis, MN, USA)

Los paneles de anticuerpos fluorescentes se diseñaron como sigue:

Tubo 1: TLR1-APC, TLR2-FITC, TLR6-PE, CD14 PerCP-Cy5, CD16/CD56 APC-H7, CD3 VioBlue, CD4 V500, CD19PE-Cy7.

Tubo 2: TLR4-FLUORESCHEIN, TLR5-FITC, TLR10-PE, CD14 PerCP-Cy5, CD16/CD56 APC-H7, CD3 VioBlue, CD4 V500, CD19PE-Cy7.

El procesamiento de la muestra se realizó en las primeras 24 horas tras su extracción y las células se analizaron mediante citometría de flujo usando un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences). En el diagrama FSC vs SSC se seleccionaron los neutrófilos, y las demás células por las tinciones correspondientes (Figura 6):

- Monocitos: CD14+
- Linfocitos totales: A partir del diagrama FSC vs SSC y por ser CD14-
 - Linfocitos B: CD14- CD3- CD19+
 - Linfocitos T: CD3+
 - TCD4: CD4+
 - TCD8: CD4- (por exclusión)
 - Células NK: CD3- CD19- CD56+
- Células dendríticas: CD14- CD3- CD19-

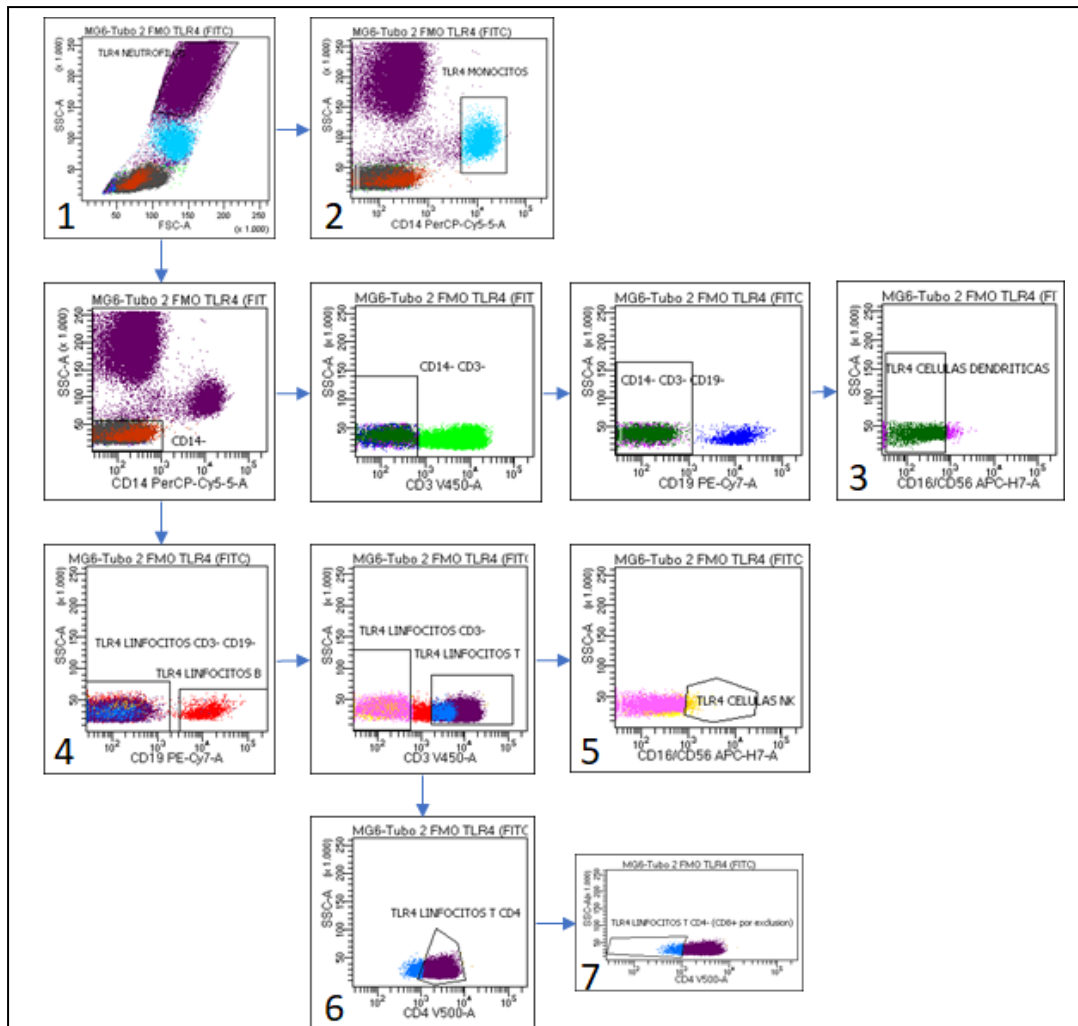
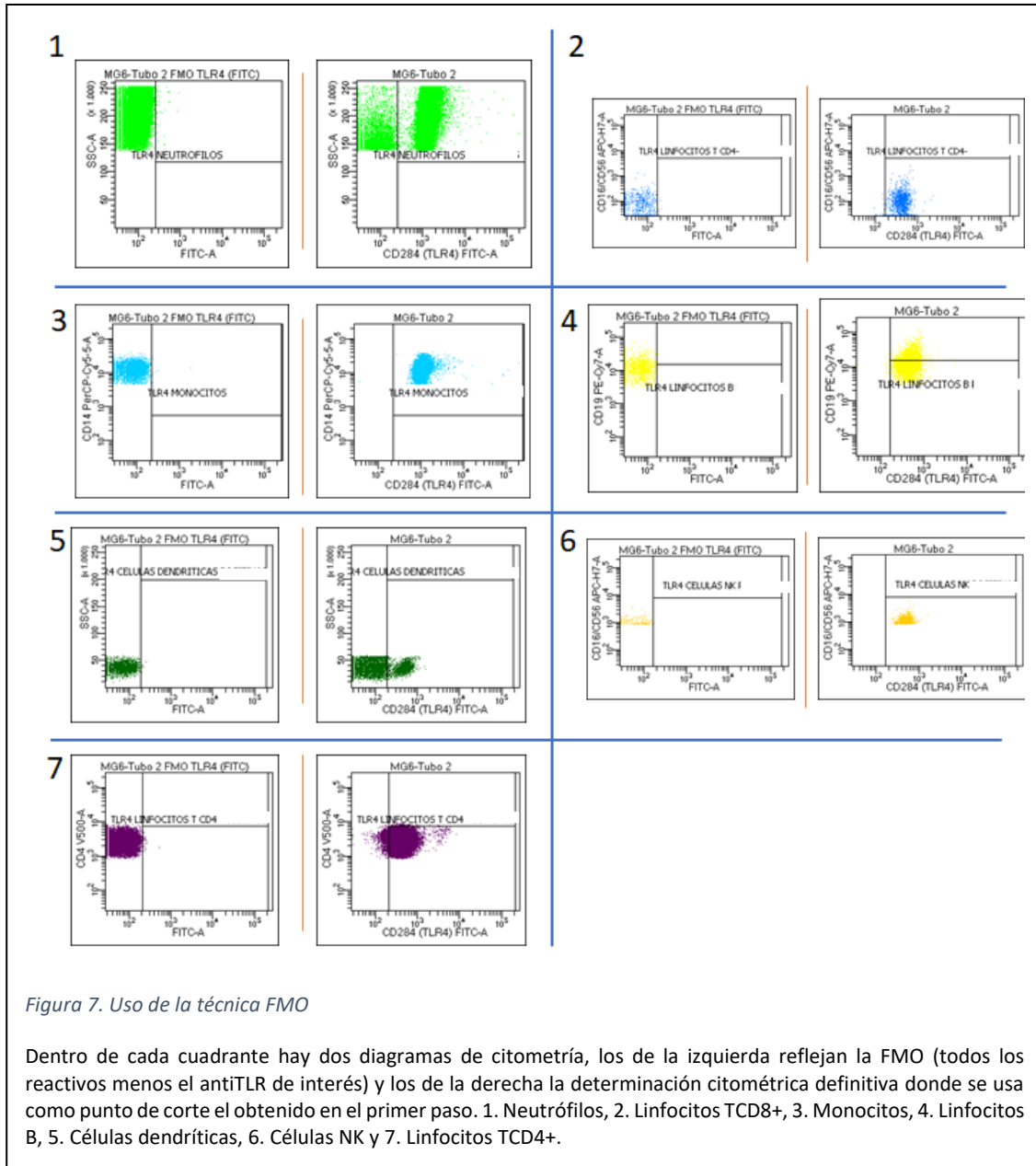


Figura 6. Esquema de la estrategia de selección de células utilizada en el estudio

1. Neutrófilos, 2. Monocitos, 3. Células dendríticas, 4. Linfocitos B, 5. Células NK, 6. Linfocitos TCD4+ y 7. Linfocitos TCD8+.

Se utilizó la técnica FMO (*fluorescence minus one*) para obtener un punto de corte apropiado para la selección de las células positivas para un determinado TLR. Para hacer esto se realiza una primera citometría con todos los anticuerpos de un panel excepto el antiTLR correspondiente y se establece como punto de corte la máxima fluorescencia obtenida en el canal sin el anticuerpo de interés; posteriormente se realiza la citometría con todos los reactivos incluyendo el antiTLR de interés (Figura 7). Esto permite excluir del análisis la autofluorescencia procedente del resto de reactivos para conocer exactamente el punto a partir del cual se considera positiva la fluorescencia del TLR de

interés. La expresión de TLR se midió y analizó utilizando el porcentaje de la población de cada línea celular que expresaban cada TLR. Los datos obtenidos de la citometría se analizaron utilizando el software FACS Diva V8.0 (BD Biosciences. CA, USA).



Niveles de anticuerpos antiRACH

Los niveles de antiRACH se determinaron por medio de ELISA (ElisaRSR[®] AChRAb Kit, RSR Limited, Cardiff, United Kingdom), siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando alícuotas de suero de 100 μ L. La descripción detallada de la técnica ha sido publicada por Hewer et al⁹², que se basa en la capacidad que tienen los antiRACH de inhibir la formación de complejos de anticuerpos marcados con biotina que se detectan por medio de su unión a estreptavidina peroxidasa, de forma que la absorbancia medida a 450 nm será menor cuanto mayor sea la concentración de antiRACH. Se consideró positiva la prueba cuando la concentración de antiRACH fue mayor de 0.45 nmol/L. Los niveles de anticuerpos fueron determinados sólo en los pacientes MG, no en los controles.

Análisis estadístico

Las variables cualitativas se resumieron usando porcentajes y su asociación se analizó por medio del test del χ^2 , las variables cuantitativas continuas se resumieron usando la media y la desviación estándar y se compararon por medio de la t de Student en caso de que tuvieran una distribución normal; en caso contrario se resumieron usando la mediana y los percentiles 25 y 75 y se compararon por medio del test de la U de Mann-Whitney. El análisis se realizó utilizando los programas Microsoft Excel 2016[®] (Redmond, Washington, Estados Unidos), SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, Nueva York, Estados Unidos) y R Statistics v. 3.4.4⁹³ (R Development Core Team).

RESULTADOS

RESULTADOS

Características de la muestra

Se estudiaron 21 sujetos (11 controles y 10 pacientes con MG). Las características clínicas de los sujetos se resumen en la Tabla 4. La distribución por sexos resultó similar en ambos grupos (sexo masculino 7 (63,6%) vs 5 (50,0%); $p = 0,67$). En lo que hace referencia a la edad, los pacientes eran mayores que los controles (43,0 años [26,5-47,0] vs 66,0 años [58,2-73,2]; $p=0,001$). La mitad de los pacientes estaban asintomáticos para el momento del estudio y la mediana de la puntuación en la escala MGC el día de la inclusión fue de 0,5 puntos ($p_{25}=0$; $p_{75}=4,2$), pero el 80% había requerido ingresar en alguna oportunidad a causa de la enfermedad y el 40% había requerido tratamientos con inmunoglobulinas intravenosas (IVIG) o recambio plasmático (PLEX) en cualquier momento de su evolución. El 70% estaban en tratamiento con prednisona para el momento del estudio con una mediana de dosis de 20 mg/d (13,75-20), un paciente estaba en tratamiento con azatioprina y no hubo ninguno con los otros inmunosupresores usados para tratar la MG (micofenolato, tacrolimus). A cuatro (40%) de los pacientes se les había realizado timectomía, a tres de ellos por timoma (de los cuales eran uno por cada una de las categorías: A, AB y B3) y a 1 como tratamiento de la enfermedad.

Tabla 4. Características de la Muestra

	Control	MG	p
	N=11	N=10	
Edad (Mediana [p25-p75])	43,0 [26,5;47,0]	66,0 [58,2;73,2]	0,001
Sexo (masculino)	7 (63,6%)	5 (50,0%)	0,670
MGC (Mediana [p25-p75])		0,5 [0,0;4,2]	
MGFA Actual:			
I	-	1 (10,0%)	-
IIa	-	2 (20,0%)	-
IIIa	-	1 (10,0%)	-
IIIb	-	1 (10,0%)	-
Asintomático		5 (50,0%)	-
MGFA máximo:			
IIb	-	3 (30,0%)	-
IIIa	-	1 (10,0%)	-
IIIb	-	4 (40,0%)	-
IVb	-	2 (20,0%)	-
Crisis miasténica	-	2 (20,0%)	-
Reagudizaciones que requirieron ingreso	-	8 (80,0%)	-
Reagudizaciones que requirieron IVIG/PLEX	-	4 (40,0%)	-
Prednisona	-	7 (70,0%)	-
Dosis de Prednisona (Mediana [p25-p75])		20 [13,75; 20]	-
Azatioprina	-	1 (10,0%)	-
antiRACH (Mediana [p25-p75])	-	34,0 [11,9;35,1]	-
Timectomía	-	4 (40,0%)	-
Hiperplasia tímica	-	1 (10,0%)	-
Timoma	-	3 (30,0%)	-
Histología del timoma (Clasificación OMS):			-
A	-	1 (10,0%)	-
AB	-	1 (10,0%)	-
B3	-	1 (10,0%)	-
Meses desde la timectomía (rango)		6-84	

En cuanto a la distribución del porcentaje de linfocitos totales y por subgrupos, así como del porcentaje de células NK, no encontramos diferencias significativas al comparar los pacientes con MG y los controles.

Tabla 5. Distribución porcentual de linfocitos y células NK

Células	Control	MG	p
Linfocitos (%)	25,25±7,4	33,26±11,8	0,08
Linfocitos T (%)	69,18±5,4	71,74±10,4	0,49
Linfocitos T CD4 (%)	94,04±7	93,98±4,3	0,98
Linfocitos T CD8 (%)	6,06±6,8	5,99±4,6	0,98
Linfocitos B (%)	24,53±10,2	25,92±17,5	0,83
Células NK (%)	5,76±4,1	5,41±3,24	0,84

Expresión de TLR de superficie en leucocitos circulantes

Tras el análisis mediante citometría de flujo para determinar la expresión de TLR en leucocitos circulantes, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los siguientes casos:

- Mayor porcentaje de linfocitos B TLR2+ en pacientes con MG respecto a controles (medianas= 11,8% [p25: 5,7; p75: 35,2] vs 5.1% [p25: 3,5; p75: 6,0], tamaño del efecto: 0.47; p = 0,035).
- Mayor porcentaje de linfocitos B TLR4+ en pacientes con MG respecto a controles (medianas= 15,4% [p25: 8,4; p75: 24,4] vs 7.8% [p25: 4,2; p75: 10,9], tamaño del efecto: 0,46; p = 0,038).
- Mayor porcentaje de células NK TLR4+ en pacientes con MG respecto a controles (medianas = 22,6 [p25: 16,4; p75: 38,3] vs 13,9 [p25: 4,6; p75: 15,7], tamaño del efecto: 0,45; p=0,045)

La expresión de los diferentes TLR se presentan a continuación, los datos se resumen en tablas y gráficos desglosados según cada uno de los tipos celulares que estudiamos en este trabajo.

Expresión de TLR en Linfocitos B

Tabla 6. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en linfocitos B

	Controles (Mediana [p25-p75])	MG (Mediana [p25-p75])	p
TLR1	6,3 (5,2-24,8)	12,65 (2,8-22,1)	0,86
TLR2	5,1 (3,1-6,2)	11,8 (5,5-40)	0,035*
TLR4	7,8 (3,3-11,1)	15,4 (6,5-25,2)	0,038*
TLR5	36,5 (10,1-50,7)	34,6 (10,7-63,8)	0,97
TLR6	14,6 (4,3-45,5)	23,5 (14,4-39,5)	0,46
TLR10	54,1 (37,6-62,3)	58,2 (30,4-67)	0,75

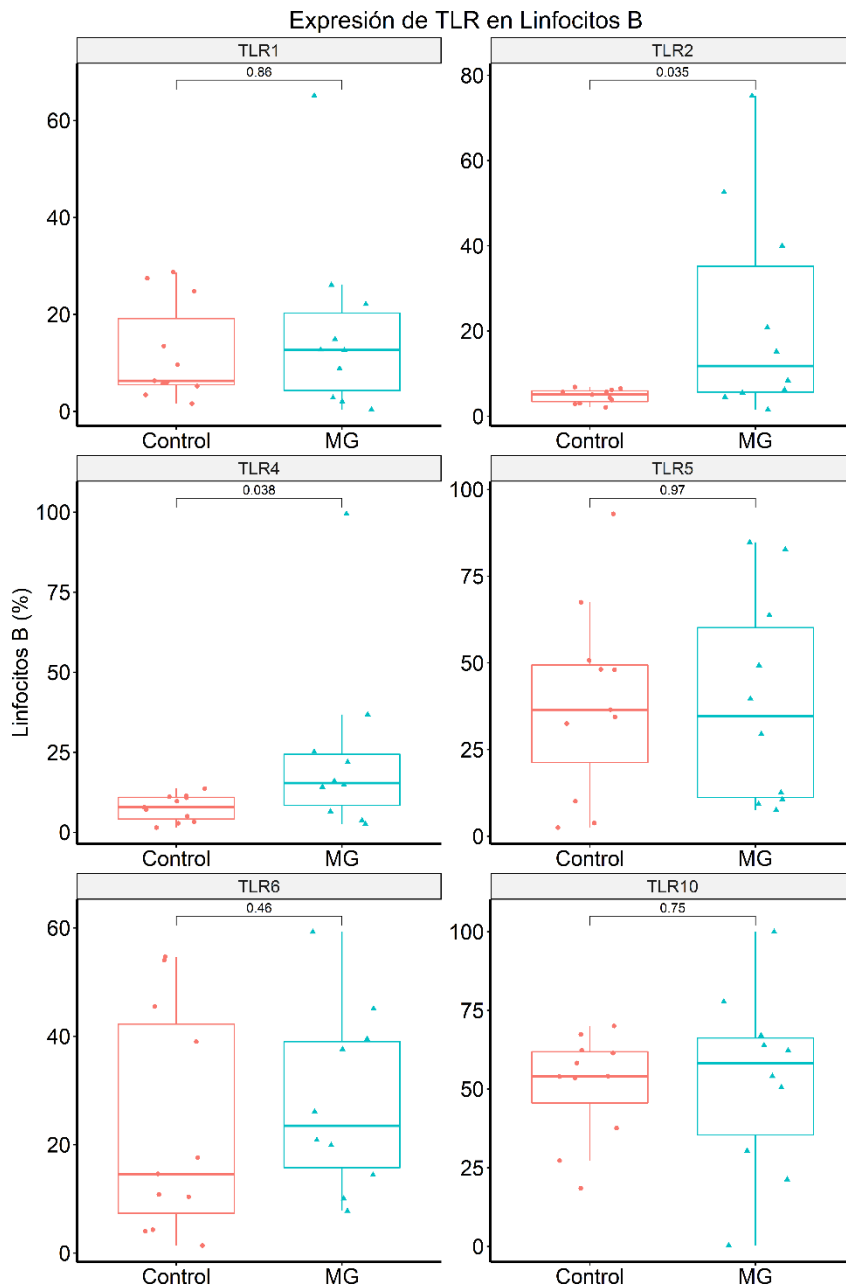


Figura 8. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Linfocitos B

Expresión de TLR en Células NK

Tabla 7. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Células NK

	Controles (Mediana [p25-p75])	MG (Mediana [p25-p75])	p
TLR1	7,6 (4,3-14,7)	6,3 (1,3-26,5)	0,97
TLR2	6,3 (3,5-11,3)	16,65 (4,8-22)	0,072
TLR4	13,9 (4,6-15,7)	22,6 (16,4-38,3)	0,045*
TLR5	19,1 (8-28,4)	16,65 (8-39,8)	0,55
TLR6	21,8 (8,2-23,8)	20,3 (12,4-34,8)	0,34
TLR10	16,7 (8,7-34)	22,75 (11,8-28,9)	0,75

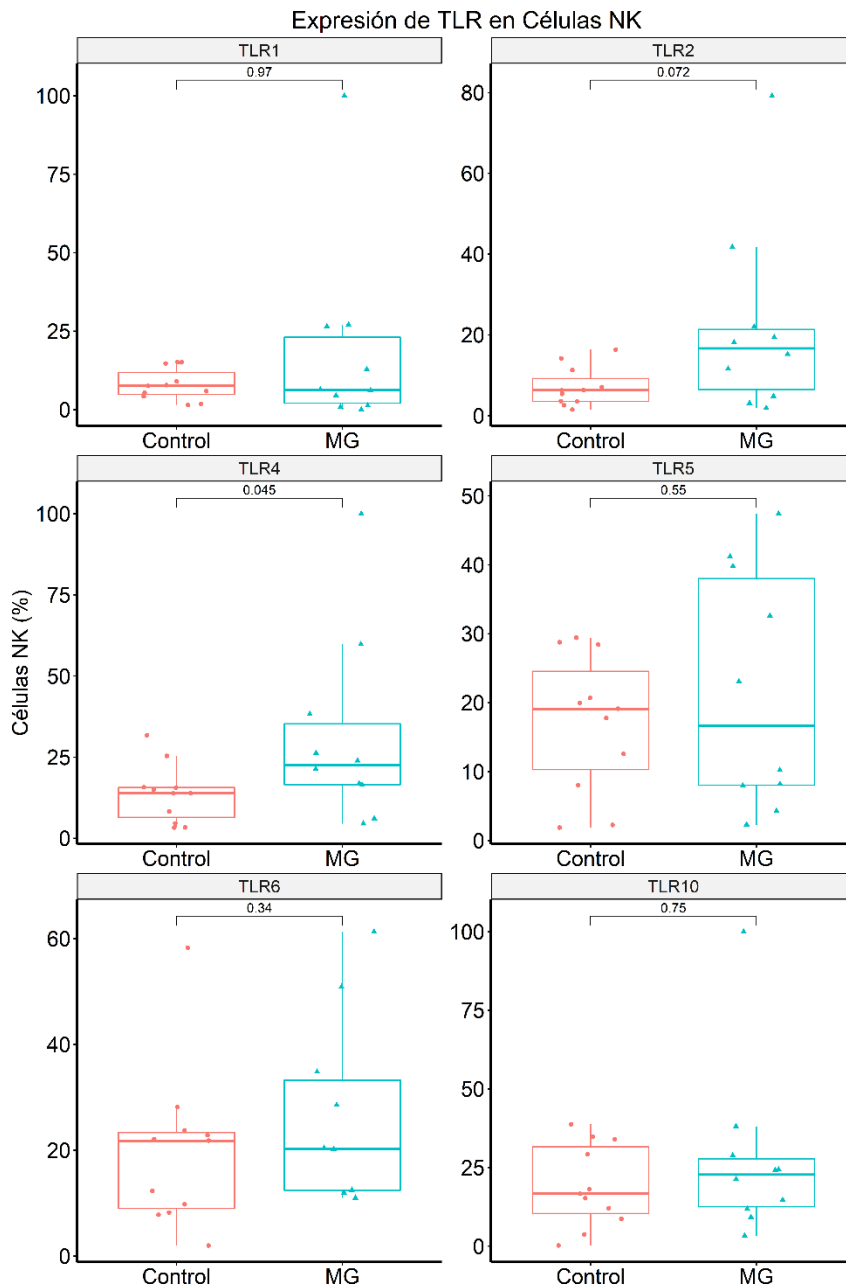


Figura 9. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Células NK

Expresión de TLR en Linfocitos T CD4+

Tabla 8. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Linfocitos T CD4+

	Controles (Mediana [p25-p75])	MG (Mediana [p25-p75])	p
TLR1	3,1 (1,9-6,7)	1,7 (0,7-4)	0,46
TLR2	2,5 (0,7-6,1)	2,2 (0,9-3,4)	0,78
TLR4	3,5 (2-11,7)	15 (2,6-22,8)	0,19
TLR5	32 (2,8-57,7)	32,8 (8,9-57,5)	0,92
TLR6	7,6 (2,9-28,9)	13,7 (8-25,7)	0,38
TLR10	4,1 (2,2-8,4)	6,3 (4,3-15,3)	0,25

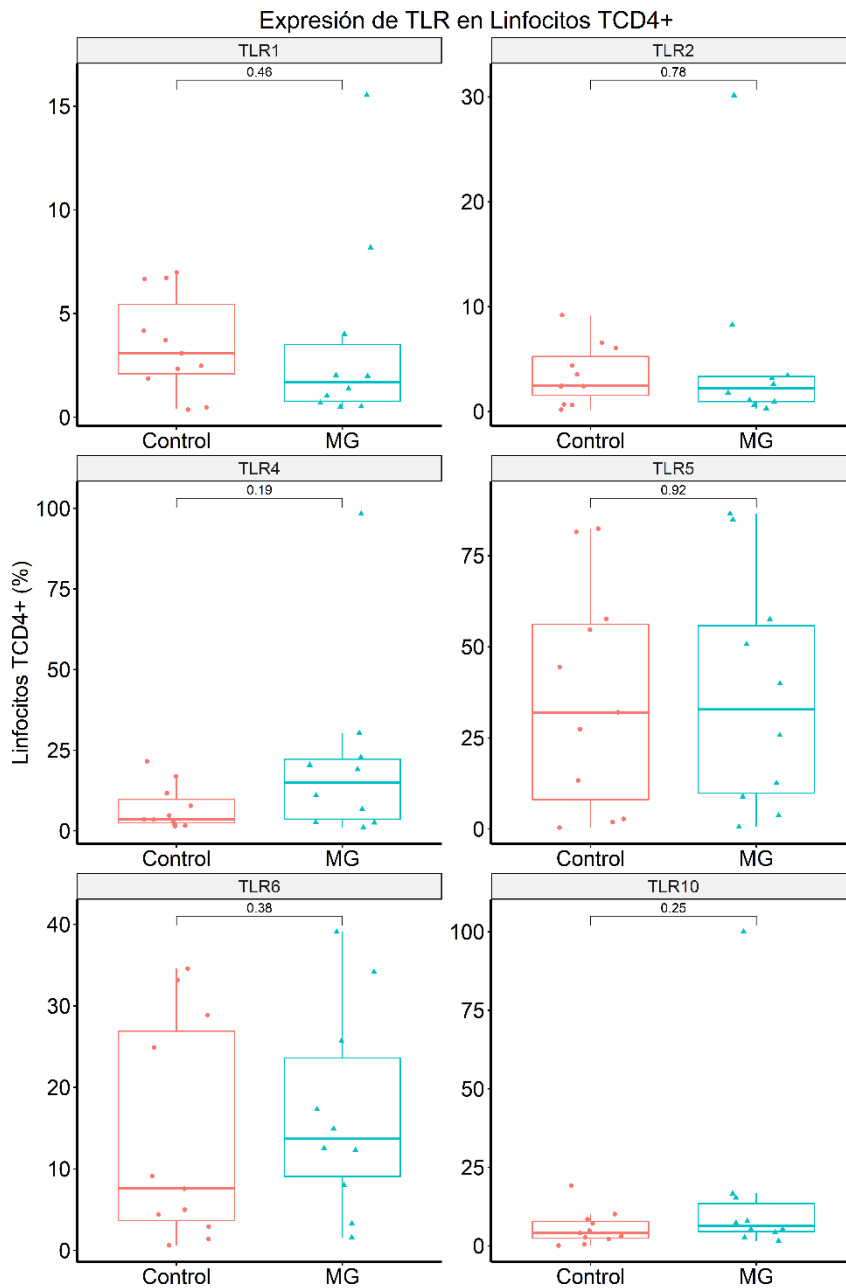


Figura 10. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Linfocitos T CD4+

Expresión de TLR Linfocitos T CD8+

Tabla 9. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en linfocitos T CD8+

	Controles (Mediana [p25-p75])	MG (Mediana [p25-p75])	p
TLR1	14 (5-33,4)	7,25 (1,8-17,3)	0,25
TLR2	25,4 (2,8-29,1)	5,85 (2-21,2)	0,31
TLR4	21,5 (7-27,2)	19,8 (18,8-25,9)	0,7
TLR5	70,4 (18,6-91,4)	51,25 (13,1-75,5)	0,46
TLR6	45,3 (11-50,7)	21,7 (10,7-33)	0,15
TLR10	20,6 (3,4-22,9)	15,7 (7,7-24)	0,65

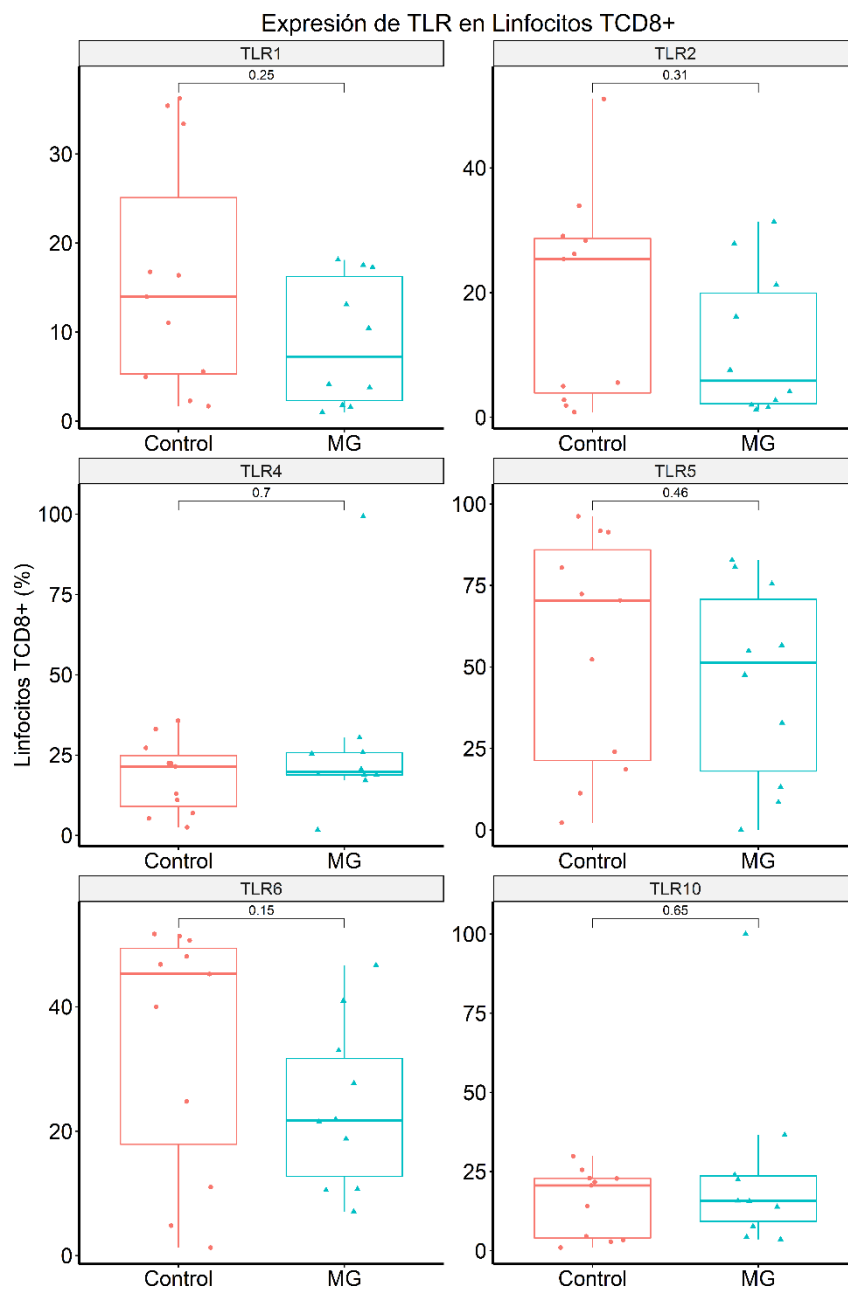


Figura 11. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Linfocitos T CD8+

Expresión de TLR en Células Dendríticas

Tabla 10. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Células Dendríticas

	Controles (Mediana [p25-p75])	MG (Mediana [p25-p75])	p
TLR1	5,9 (2,3-6,7)	2,7 (1,2-8,5)	0,78
TLR2	5,8 (4,2-8,4)	10 (5,8-16,3)	0,12
TLR4	9,6 (6,6-14)	8,8 (8,2-16,7)	0,89
TLR5	14 (5,4-37,8)	22,6 (5,4-47,6)	0,67
TLR6	9,9 (5,4-21,7)	10,55 (2,7-19,7)	0,86
TLR10	6,8 (3,6-11,7)	9,5 (4,6-15,7)	0,6

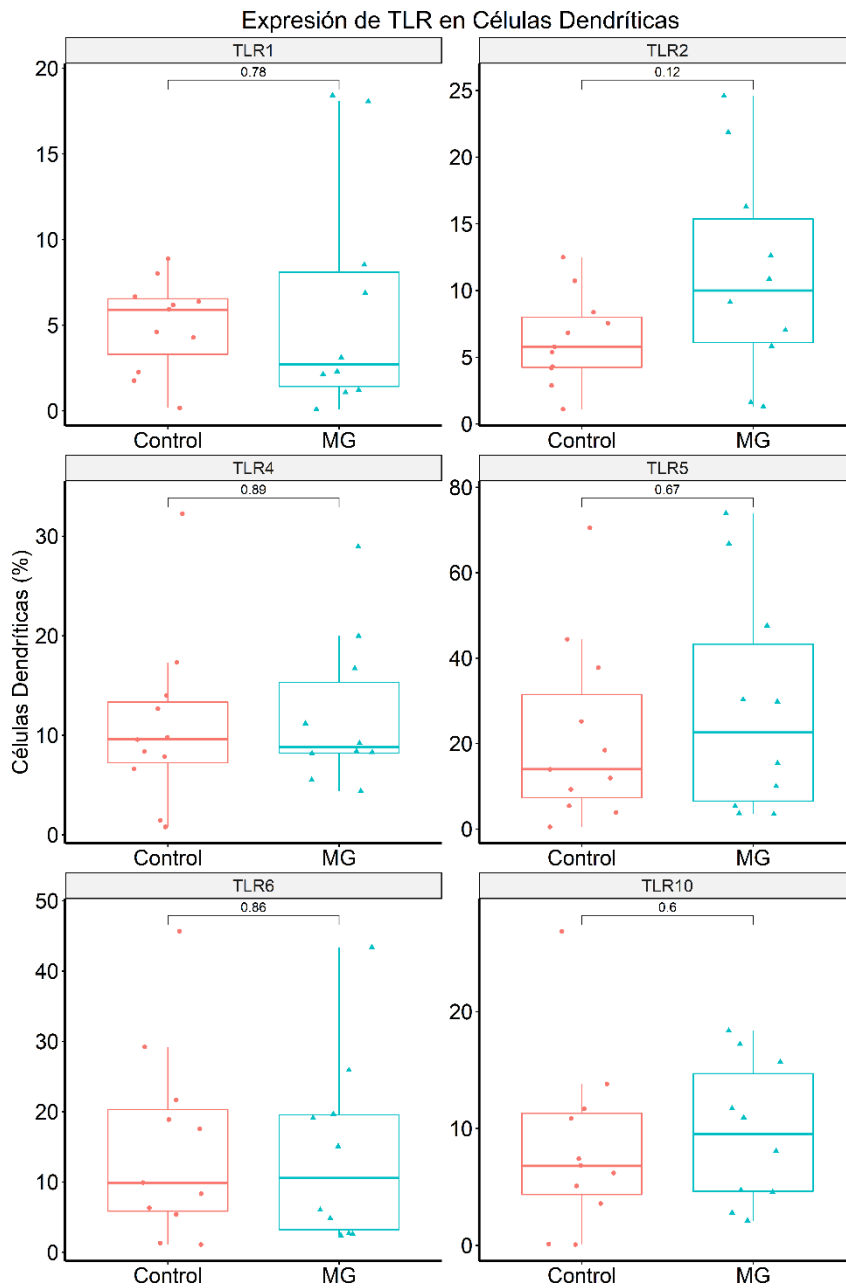


Figura 12. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Células Dendríticas

Expresión de TLR en Monocitos

Tabla 11. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Monocitos

	Controles (Mediana [p25-p75])	MG (Mediana [p25-p75])	p
TLR1	14,9 (3,4-37,2)	3,25 (0,9-11,1)	0,13
TLR2	100 (100-100)	100 (100-100)	0,15
TLR4	15,9 (10,8-24,6)	14,75 (4,8-20,4)	1
TLR5	10,5 (5,1-13,7)	14,35 (6,2-22,2)	0,5
TLR6	48,3 (27,4-72,7)	24,45 (9,1-54,5)	0,34
TLR10	43,8 (7,4-61,4)	16,75 (4,6-60,9)	0,53

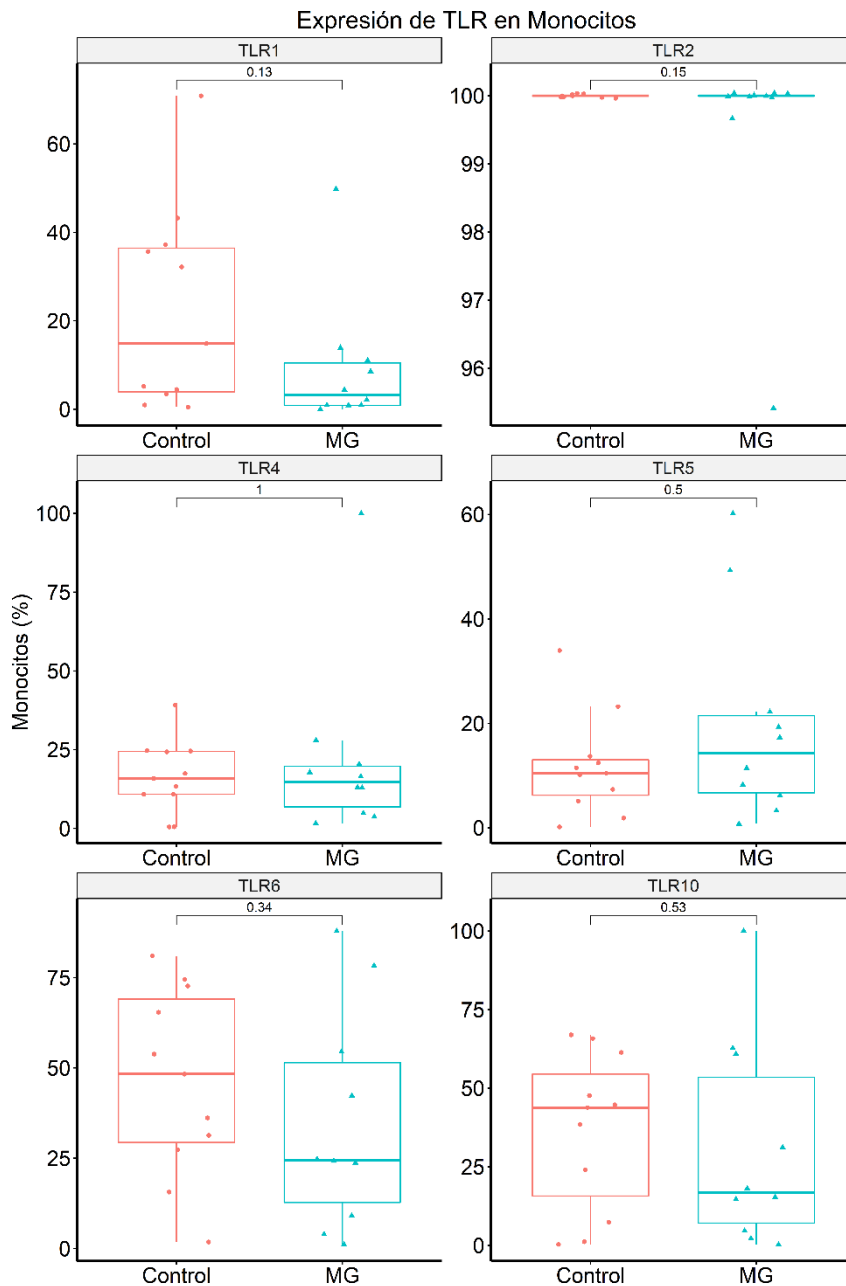


Figura 13. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Monocitos

Expresión en Neutrófilos

Tabla 12. Comparación de las medianas del porcentaje de expresión de TLR en Neutrófilos

	Controles (Mediana [p25-p75])	MG (Mediana [p25-p75])	p
TLR1	8,8 (2,2-21,8)	1,35 (0,6-3,7)	0,072
TLR2	89,2 (70,4-91,5)	82,6 (63,3-99,3)	0,94
TLR4	23,3 (3,8-46)	33,1 (4,5-41,9)	0,75
TLR5	89,2 (70,4-91,5)	39,8 (11-82,1)	0,7
TLR6	34,2 (11,1-78,9)	28,5 (11-63,9)	0,65
TLR10	8,3 (4,6-40)	2,7 (1,3-28,5)	0,36

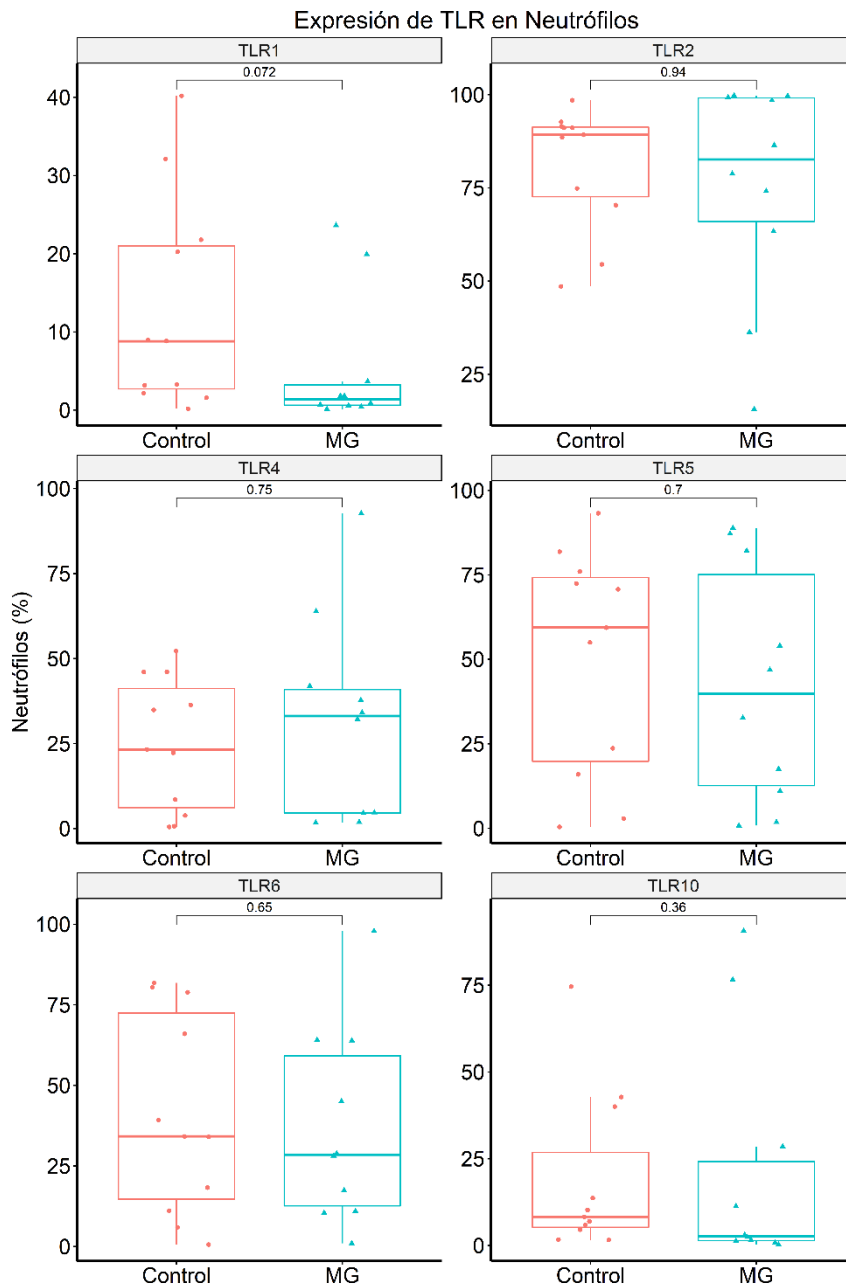


Figura 14. Comparación de la expresión de los diferentes TLR en Neutrófilos

Expresión de TLR de superficie en linfocitos B y correlación con los niveles de antiRACH

A la vista de los resultados anteriores, analizamos la relación entre la expresión de aquellos TLR expresados en linfocitos B que resultaron significativamente diferentes entre los grupos en estudio.

La relación entre el porcentaje de linfocitos B TLR4+ (LBTLR4+) y la concentración de antiRACH siguió una distribución logarítmica encontrándose una correlación significativa positiva ($R^2 = 0.512$; $p = 0.03$, Figura 15). No encontramos correlación entre el porcentaje de linfocitos B TLR2+ (LBTLR2+) y la concentración de antiRACH.

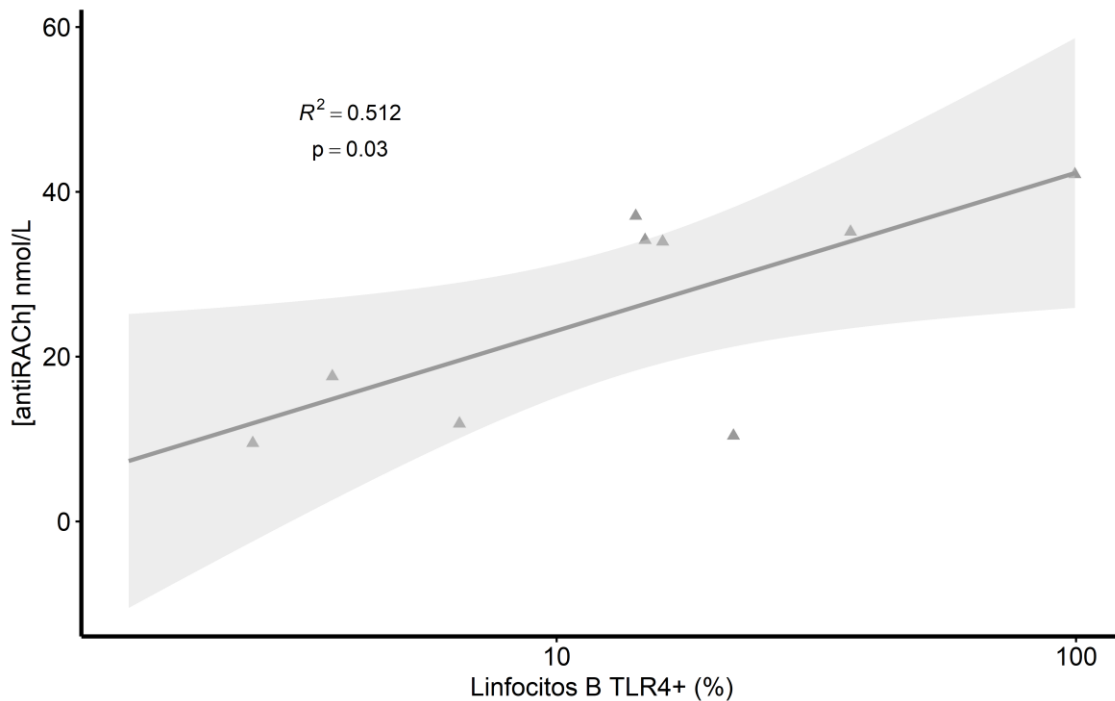


Figura 15. Correlación entre la expresión de TLR4 en linfocitos B y los niveles séricos de antiRACH

Encontramos también una correlación positiva estadísticamente significativa entre el porcentaje de linfocitos B TLR6+ (LBTLR6+) y los niveles de antiRACH, que igual que en el caso de los linfocitos B TLR4 + siguió una distribución logarítmica ($R^2 = 0,535$, $p = 0,025$; Figura 16). No hubo correlación de los niveles de antiRACH con el resto de resto de TLR de superficie expresados en linfocitos B.

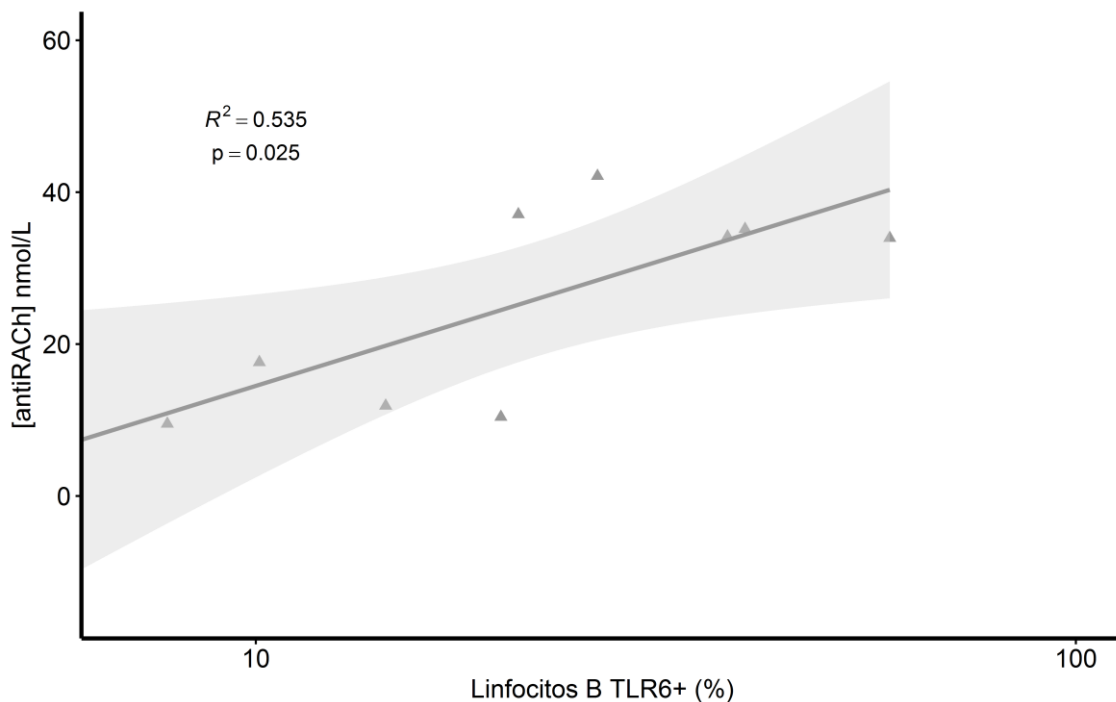


Figura 16. Correlación entre los niveles de antiRACH y el porcentaje de linfocitos B TLR6+

Puesto que TLR1 y TLR6 pueden formar dímeros funcionales con TLR2, analizamos la asociación entre los niveles de antiRACH y los linfocitos B que expresaban ambas combinaciones y no encontramos una correlación significativa entre ambos parámetros (Linfocitos B TLR2+TLR1+: $R^2 = -0,1$; $p = 0,8$ y Linfocitos B TLR2+TLR6+: $R^2 = -0,03$; $p = 0,9$).

Expresión de TLR4 en Células NK y su correlación con los niveles de antiRACH

Obtuvimos una correlación positiva estadísticamente significativa entre el porcentaje de células NK TLR4+ y los niveles de antiRACH, siguiendo también una distribución logarítmica ($R^2 = 0,475$; $p = 0,04$; Figura 17)

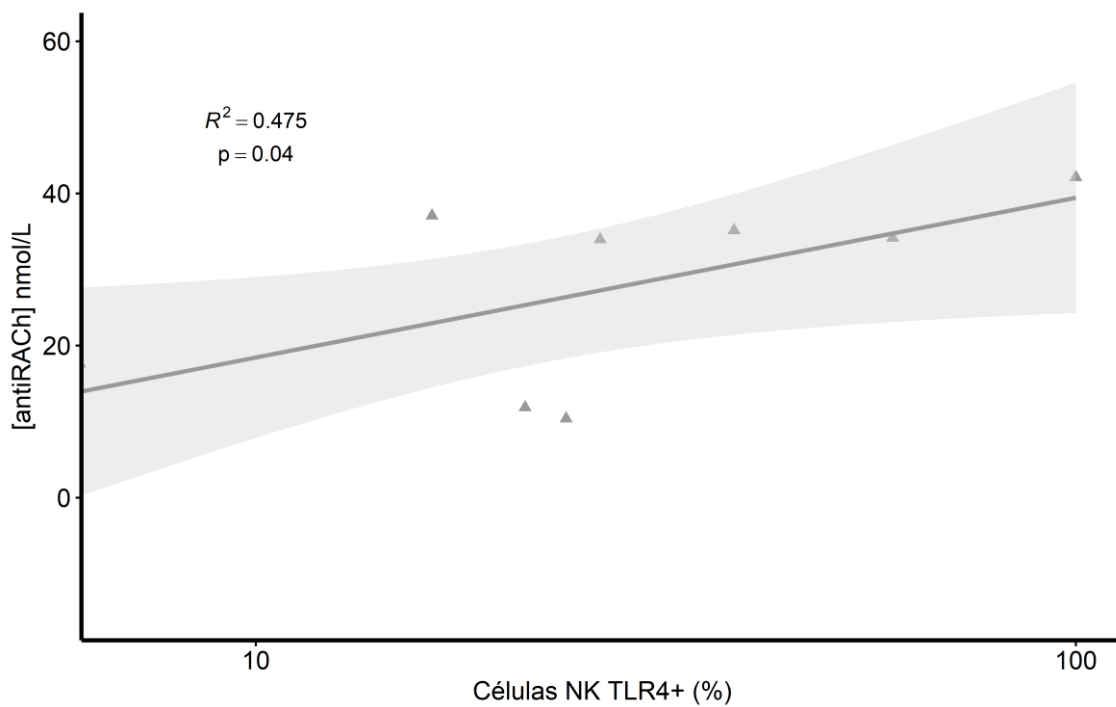


Figura 17. Correlación entre los niveles de antiRACH y el porcentaje de células NK TLR4+

Correlación entre expresión de TLR y edad

Puesto que la edad fue significativamente menor en el grupo control, para valorar la influencia de este factor sobre los resultados obtenidos analizamos la correlación entre el porcentaje de LBTLR2+, LBTLR4+ y Células NK TLR4+ con la edad y no encontramos correlación significativa entre estos parámetros al ajustarlos por la presencia de la enfermedad (correlaciones parciales, método de Spearman: LBTLR2+/Edad: coeficiente: 0,26; $p = 0,25$; LBTLR4+/Edad: coeficiente: 0,20; $p = 0,38$; NKTLR4+/Edad: coeficiente: -0,09; $p=0,68$; Figura 18).

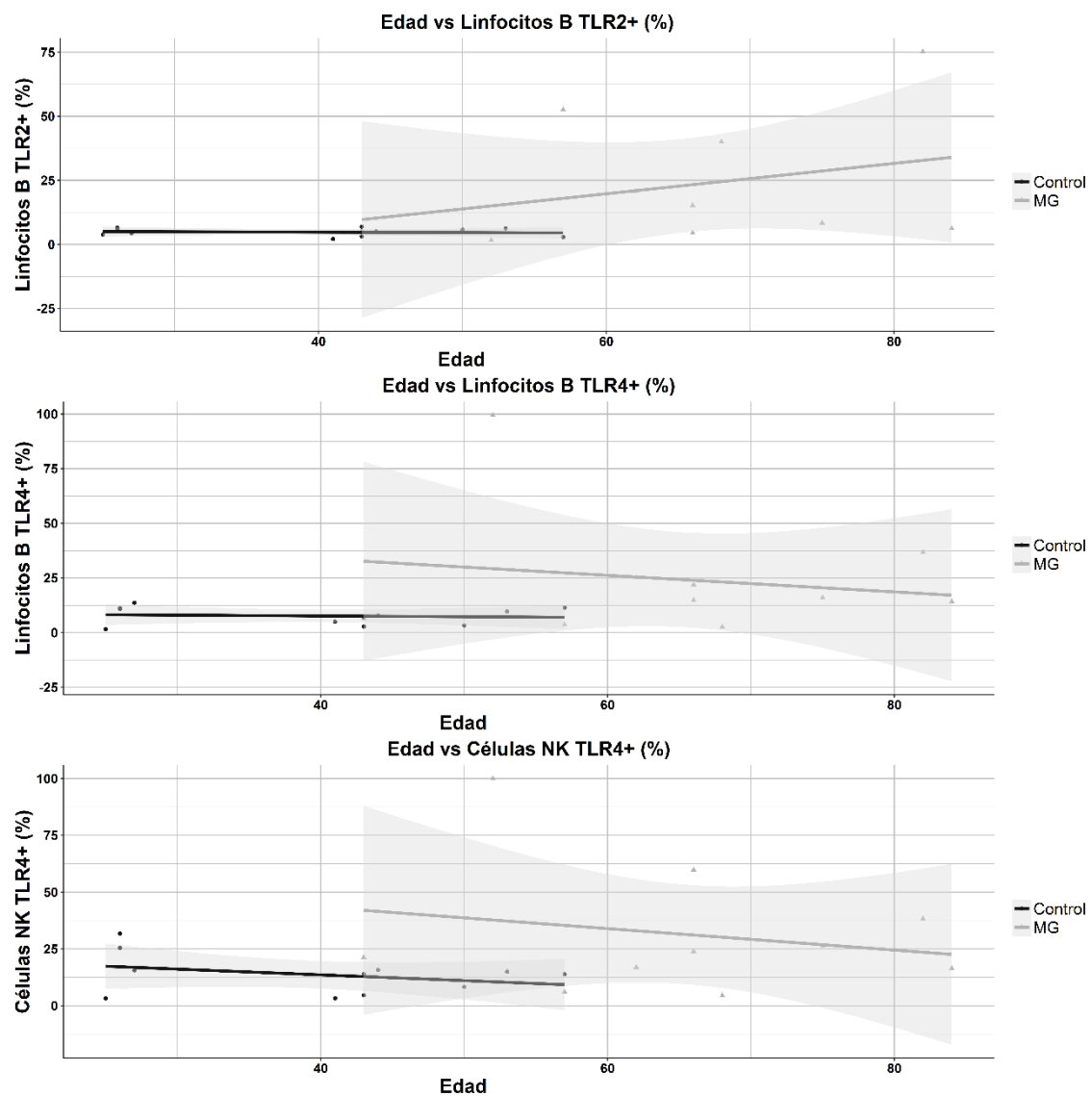


Figura 18. Correlación entre el porcentaje de TLR de cada célula y la edad.

Expresión de TLR y parámetros clínicos

Analizamos la expresión de los TLR en los leucocitos que resultaron significativamente diferentes entre los grupos en estudio y no encontramos diferencias en cuanto a sexo, tratamiento actual con prednisona, antecedente de timoma y situación clínica del paciente (escalas MGCS y MGFA). Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Análisis de la Expresión de TLR y su relación con parámetros clínicos

		Linfocitos B TLR2+ (%)	p	Linfocitos B TLR4+ (%)	p	Células NK TLR4+ (%)	p
Sexo (mediana [p25- p75])	Masculino	20,8 (6,2-52,6)	0,18	21,9 (14,2-25,2)	0,51	16,9 (16,4-23,9)	0,51
	Femenino	8,4 (5,5-15,2)		14,8 (6,5-16)		26,3 (21,3-59,8)	
Prednisona (mediana [p25-p75])	No	52,6 (6,2-75,2)	0,4	14,2 (3,7-36,8)	1	16,4 (6,1-38,3)	0,42
	Sí	8,4 (4,5-20,8)		16 (6,5-25,2)		23,9 (16,9-59,8)	
Timoma (mediana [p25-p75])	No	20,8 (5,5-52,6)	0,38	14,2 (3,7-25,2)	0,18	16,9 (6,1-23,9)	0,33
	Sí	8,4 (1,6-15,2)		16 (14,8-99,5)		59,8 (26,3-100)	
Puntuación MGCS (coeficiente de correlación)		-0,4	0,2	-0,35	0,31	-0,22	0,5
Escala MGFA (coeficiente de correlación)		0,45	0,18	0,06	0,85	-0,07	0,84

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El principal resultado de este trabajo es que, en comparación con sujetos sanos, los pacientes con MG tienen un mayor porcentaje de linfocitos B TLR2+ y TLR4+ y de células NK TLR4+, además, el porcentaje de linfocitos B TLR4+ y TLR6+, así como el de células NK TLR4+ se correlacionó directamente con los niveles de antiRACH en suero.

Expresión de TLR en Linfocitos B y su relación con la Miastenia Gravis

No hemos encontrado en la literatura trabajos que aborden específicamente la expresión proteica de TLR en leucocitos circulantes en pacientes con MG, sin embargo, existen algunos estudios que pueden darle contexto a nuestros resultados. En modelos experimentales murinos de lupus eritematoso sistémico, la administración de LPS (agonista de TLR4) exagera la enfermedad⁹⁴ y por medio de la administración de LPS a ratones en conjunto con derivados de colágeno se puede inducir el desarrollo de artritis autoinmune⁹⁵, estas son respuestas inespecíficas que podrían estar mediadas por las múltiples células que expresan TLR4. De forma más específica, el LPS aumenta la producción de anticuerpos autorreactivos y desencadena el desarrollo de procesos autoinmunes⁹⁶ y la síntesis de anticuerpos se ve favorecida directa y específicamente por LPS sin necesidad de la participación de otras células del sistema inmunitario y este efecto es mediado por TLR4⁹⁷. De igual forma, la activación de TLR2 en linfocitos B puede inducir la producción (*in vitro*) de autoanticuerpos⁹⁸ y la activación tanto de TLR2 como de TLR4 también media la proliferación de los linfocitos B e induce la conmutación de clase (*class switch*) y la producción de inmunoglobulinas^{99,100}.

En humanos, en un estudio similar al nuestro pero en pacientes con lupus eritematoso sistémico, encontraron hallazgos similares, con mayor porcentaje de linfocitos B TLR2+ y TLR4+ en comparación con controles¹⁰¹. De igual forma, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa) existe un mayor porcentaje de LBTLR2+¹⁰² y LBTLR4+¹⁰³ circulantes. En otra investigación pero en pacientes con asma, que es una enfermedad de base inmunitaria pero donde precisamente los linfocitos B no tienen un papel clave y cuya patogenia es muy diferente a la de la MG, no encontraron diferencias en la expresión de TLR2 o TLR4 en comparación con sujetos sanos¹⁰⁴.

En los pacientes con MG se ha descrito un aumento de los niveles del factor activador de BAFF que además se correlaciona con los niveles séricos de antiRACH³⁰, una situación similar ocurre en el síndrome antifosfolípidos en el que los niveles de BAFF se correlacionan con la producción de anticuerpos anti β_2 -glicoproteína¹⁰⁵ (un anticuerpo patógeno en dicho síndrome), esta proteína es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral que se produce principalmente en macrófagos y neutrófilos y al unirse a su receptor en el linfocito B estimula su proliferación y la producción de inmunoglobulinas y para que BAFF pueda producir este efecto se requiere de la presencia de TLR4 activado por su ligando^{106,107}.

Aunque no hemos encontrado en la literatura una posible relación entre TLR6 y la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, resulta interesante el hecho de que además de formar dímeros con TLR2 (tal como se mencionó en la introducción), TLR6 también lo hace con TLR4, específicamente se ha descrito que en macrófagos y en la microglía la conformación de un complejo heterotrimérico (CD36-TLR4-TLR6) funciona como receptor de lipoproteínas aterogénicas (LDL oxidada) y de la proteína

beta amiloide respectivamente y que tras la unión a sus ligandos estos receptores desencadenan la producción de interleucinas proinflamatorias¹⁰⁸. Los linfocitos B en reposo expresan CD36 y por medio de la interacción con TLR2, al activarse ambos receptores, se potencia la producción de anticuerpos¹⁰⁹ y, aunque no haya sido estudiado, no es descartable que existan complejos heterogéneos que combinen CD36, TLR2, TLR4 o TLR6 en los linfocitos B y que estos participen en la potenciación de la respuesta inmunitaria y la producción de anticuerpos.

Nuestros resultados se enmarcan perfectamente en los hechos que hemos mencionado, el mayor porcentaje de LBTLR2+ y LBTLR4+ de los pacientes con MG podría formar parte de una alteración constitutiva de los sujetos que padecen enfermedades autoinmunes sin que necesariamente sea una situación causal de las mismas, puesto que sucede en otras enfermedades relacionadas (lupus, enfermedad inflamatoria intestinal); el mayor porcentaje de estas células implica una mayor “oferta” de estos receptores que podría predisponer a los clones de linfocitos B autorreactivos que hayan escapado de los controles de la autorreactividad en el timo a que tengan mayor tendencia a la proliferación celular y a la producción de autoanticuerpos, esto podría incluso explicar el empeoramiento de los pacientes con miastenia durante cuadros infecciosos, que suele ser más grave en el caso de infecciones bacterianas, donde el LPS jugaría un papel fundamental o, también, la mejoría clínica que se aprecia en modelos experimentales de MG autoinmune tras la regulación de la microbiota intestinal por medio de la administración de probióticos¹¹⁰. Más interesante aún es el hecho de que las inmunoglobulinas intravenosas, uno de los tratamientos utilizados para las reagudizaciones y las crisis en los pacientes con miastenia, parecen regular de forma negativa la transcripción de los genes de diversos TLR y de los efectores de su cadena de

señalización^{111,112}, así que es posible que durante años hayamos estado tratando un aspecto específico de la inmunopatogenia de la enfermedad sin saberlo.

Expresión de TLR en células NK y su relación con la Miastenia Gravis

Las células NK tienen un papel importante en el desarrollo de síndromes autoinmunes, estas células son parte del sistema inmunitario innato, son linfocitos que se generan en la médula ósea y su principal función es la de atacar directamente y sin mediación de anticuerpos a otras células que evidencian señales de “peligro” como puede ser la ausencia de expresión del MHC-I (del inglés *Major Histocompatibility Complex*), las células NK maduran en la propia médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y el timo. En condiciones normales las células NK existen en dos fenotipos diferentes, a saber CD56^{bright} y CD56^{dim}, las primeras son secretoras de citocinas y tienen poco potencial citotóxico a diferencia de las segundas que sí presentan un potencial citotóxico completo y son las que predominan en la circulación sanguínea¹¹³. Aunque el principal efecto de las células NK es el de inducir la citólisis, medida por granzimas, de células tumorales o infectadas por virus, estas también pueden participar en el desarrollo de autoinmunidad, principalmente de forma indirecta puesto que pueden influir en la actividad presentadora de antígenos de las células dendríticas induciendo la proliferación de linfocitos B y T autorreactivos, además también pueden producir citocinas que favorecen la producción de IFN- γ de los macrófagos y orientar la actividad inmunitaria a respuestas Th1¹¹⁴. Las células NK pueden aumentar su producción de IFN- γ ante la presencia de LPS pero este efecto parece ser independiente de TLR4¹¹⁵.

Puesto que las células NK participan principalmente en procesos tumorales o virales, su intervención en las enfermedades autoinmunes es menos conocida, p. ej. en la cirrosis

biliar primaria las células NK estimuladas por agonistas de TLR destruyen las células epiteliales biliares en presencia de IFN- α y estas células tienen mayor capacidad citotóxica en pacientes con la enfermedad en comparación con controles¹¹⁶. En un estudio con pacientes con vasculitis asociadas a ANCA (anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos) encontraron que los casos tenían un mayor porcentaje de células NK TLR4+ en comparación con los controles y sus autores relacionan este hecho con una expresión de un estado proinflamatorio sistémico más que con una actividad local de estas células sobre los vasos inflamados¹¹⁷. Souza-Fonseca et al¹¹⁸ demostraron que la expresión de TLR4 en células NK de sujetos sanos es principalmente intracelular y que en la sepsis la expresión de TLR4 de superficie es mucho mayor en comparación con procesos inflamatorios como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (no infeccioso) , probablemente se trate de un proceso de traslocación del receptor mediado por citocinas liberadas por otras células del sistema inmunitario.

Hay algunos datos que reflejan la posible participación de las células NK en la MG, el estudio de Suzuki et al¹¹⁹ evidenció que en pacientes con timoma el porcentaje de células NK^{dim} circulantes es menor que en sujetos sanos y tras el tratamiento con timectomía estos porcentajes vuelven a la normalidad, además no encontraron diferencias en cuanto al porcentaje de estas células presentes en el timo en controles, pacientes con hiperplasia tímica y pacientes con timoma, sus autores consideran que esto podría ser el reflejo de que las células NK se encuentran movilizadas a la unión neuromuscular desde el compartimiento sanguíneo. En el aspecto terapéutico, Chien et al¹²⁰ estudiaron la capacidad citotóxica de las células NK (medida por la capacidad lítica ante células K562) antes y después del tratamiento con plasmaféresis y encontraron que la citotoxicidad mediada por células NK disminuye tras la intervención y que este efecto

fue superior en los pacientes que tuvieron una mayor mejoría clínica. Por otra parte, el tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas (IVIG, del inglés *intravenous immunoglobulins*) aumentó la actividad de las células T reguladoras mediada por células NK en un modelo de encefalomiелitis alérgica experimental (el modelo animal de la esclerosis múltiple) evitando el desarrollo de la enfermedad en los animales tratados¹²¹.

Shi et al¹²² hicieron un estudio extensísimo sobre la implicación de las células NK en el modelo murino de MG, estos fueron sus hallazgos:

- Los animales deplecionados de células NK tardan más en desarrollar el cuadro miasténico tras la inmunización con RCh.
- La actividad de las células NK es mayor en los animales inmunizados en comparación con los controles, estas células además tienen mayor tasa de producción de IFN- γ .
- El número de linfocitos B secretores de antiRCh es menor en los animales deplecionados de células NK.
- Las cepas de ratones cuyas células NK son incapaces de responder a IFN- γ (IL-18^{-/-}) son resistentes a la inmunización por RCh, a pesar de que los linfocitos T de estos ratones no perdieron la capacidad de reaccionar al reto antigénico por RCh.

Los autores del trabajo concluyeron que las células NK participan directamente en el desarrollo de la MG experimental mediando la respuesta humoral de los linfocitos B tras la inmunización con RCh.

De lo anterior podemos proponer que nuestros resultados, en los que observamos un mayor porcentaje de células NK TLR4+ en los pacientes con MG, orientan a la participación de estas células y de dicho receptor en la patogenia de la MG, si existe una mayor proporción de estas células que posiblemente se encuentre en un estado de actividad mayor, estas pueden estar influyendo en la actividad de la enfermedad y además lo anterior también podría explicar la correlación entre el porcentaje de células NK TLR4+ y los niveles de antiRACH de nuestros pacientes.

Una visión integrada y resumida de los hallazgos de este trabajo se puede apreciar en la Figura 19. Proponemos que la activación de TLR2, 4 o 6 desencadenada por antígenos exógenos o activadores endógenos induce la proliferación de los linfocitos B y una mayor síntesis de antiRACH en aquellos que son autorreactivos, estos anticuerpos al depositarse activan el complemento y se genera una respuesta inflamatoria que podría influir sobre la síntesis de interferón en las células NK, es posible que TLR4 influya también sobre la actividad de estas células, que en cualquier caso, hacen que predomine la respuesta tipo Th1.

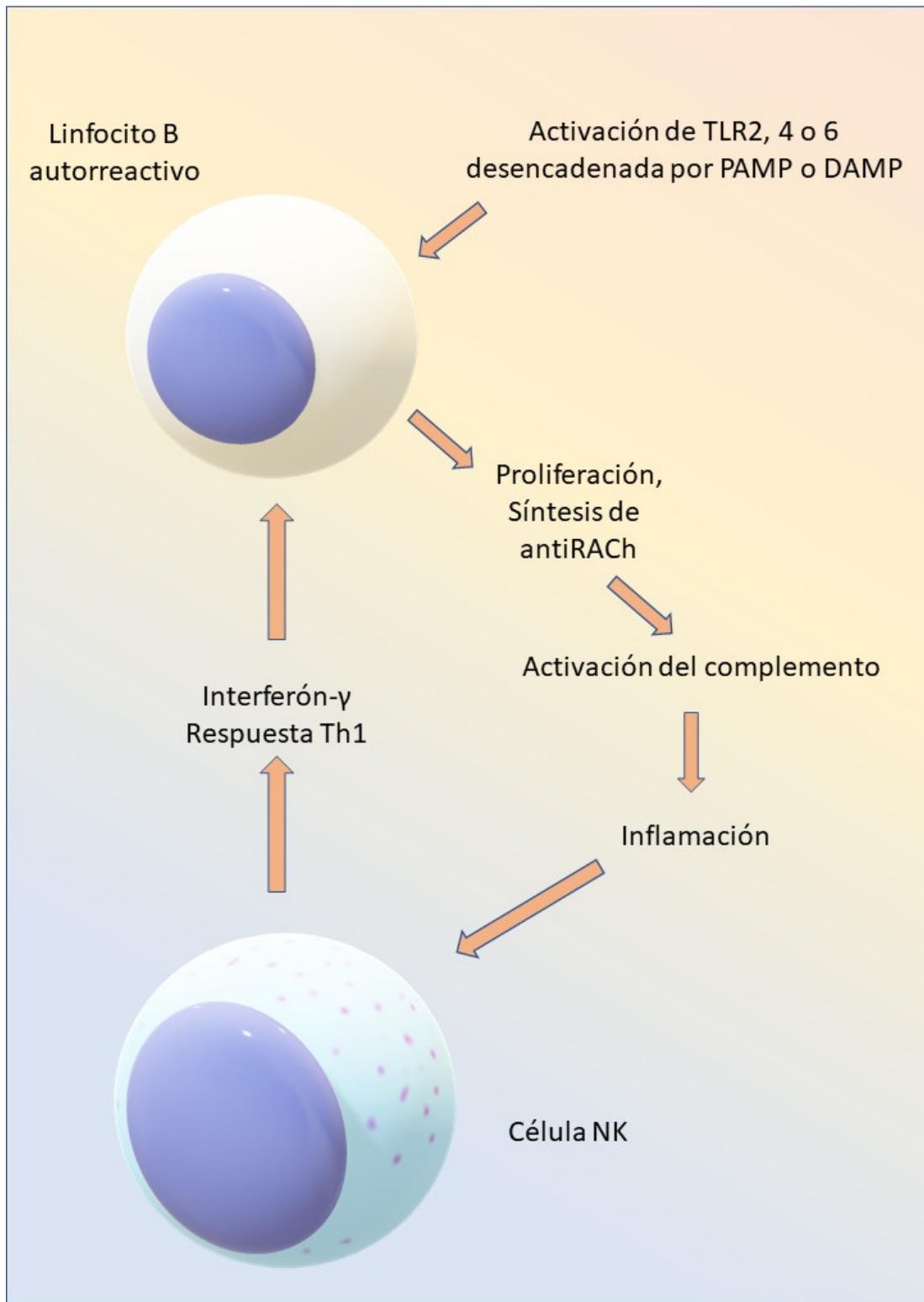


Figura 19. Visión integrada de nuestros hallazgos en la patogenia de la MG

Aspectos Clínicos

En nuestro estudio no encontramos correlación entre las características inmunológicas que hemos descrito y los diferentes parámetros clínicos, esto no es de extrañar puesto que en prácticamente todos los estudios relacionados que hemos descrito en este apartado prácticamente nunca se llega a evidenciar una correlación directa con la clínica de los hallazgos, en nuestro estudio esto se puede explicar principalmente por la heterogeneidad y tamaño reducido de nuestro grupo de pacientes, por la complejidad del entramado de células y efectores humorales implicados en la enfermedad lo que dificulta que una única alteración molecular vaya a modificar lo suficiente y de forma independiente la situación clínica de un paciente y porque al dividir los pacientes en subgrupos (p. ej. pacientes tratados con prednisona) estos son extremadamente reducidos lo que dificulta realizar un análisis estadístico fiable.

Limitaciones del estudio

Nuestro trabajo tiene algunas limitaciones, en cuanto la muestra los pacientes no han sido seleccionados tras un procedimiento de aleatorización por lo que puede existir un sesgo de selección, el tamaño de la muestra es relativamente pequeño, obtener muestras grandes de pacientes con enfermedades infrecuentes y que además no tengan otras comorbilidades relevantes en un plazo de tiempo razonable entraña una gran dificultad y sólo es abordable en estudios multicéntricos, también la metodología del estudio con citometría de flujo limita la cantidad de pacientes que se pueden estudiar, no sólo por su coste que es relativamente elevado sino porque estos análisis requieren que la muestra se procese y analice en las primeras 24 horas tras su extracción y además

porque los citómetros son equipos poco disponibles en los centros de investigación, todo esto explica en parte nuestro tamaño muestral.

Perspectivas futuras

Nuestros resultados orientan hacia la participación de determinados TLR en la patogenia de la MG, sin embargo, convendría realizar estudios más extensos y profundos que permitan discernir el grado de implicación de estos, p. ej. realizando estudios funcionales de los linfocitos B de estos pacientes para valorar su reactividad ante estímulos antigénicos o ante el LPS, podría estudiarse específicamente el subgrupo de linfocitos B productores de antiRACH o los subgrupos de células NK circulantes para poder determinar con exactitud cuáles de estas células son las que expresan TLR en estos pacientes.

En el momento en el que los moduladores o inhibidores específicos de TLR4 que están en estudio actualmente (algunos de ellos en fase clínica, mencionados en las bases de datos de ensayos clínicos de EEUU pero sin resultados publicados) superen los ensayos clínicos fase I, es evidente que la MG sería una enfermedad en la que convendría ensayar clínicamente la utilidad de estos medicamentos en diferentes aspectos de la enfermedad como podrían ser el control inmunitario a largo plazo, el tratamiento de pacientes refractarios o el tratamiento de la crisis miasténica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expresión de receptores TLR de superficie en leucocitos circulantes es diferente en pacientes con MG en comparación con controles sanos.
2. En nuestro estudio encontramos las siguientes alteraciones inmunológicas en los pacientes con MG en comparación con controles sanos:
 - Mayor porcentaje de linfocitos B TLR2+
 - Mayor porcentaje de linfocitos B TLR4+
 - Mayor porcentaje de células NK TLR4+
3. Los niveles de antiRACH se correlacionaron positivamente con:
 - El porcentaje de linfocitos B TLR4+
 - El porcentaje de linfocitos B TLR6+
 - El porcentaje de células NK TLR4+
4. No encontramos asociación entre las alteraciones inmunológicas y las características clínicas de los pacientes en cuanto a edad, sexo, tratamiento con prednisona, antecedente de timoma y situación clínica (medida por las escalas MGCS y MGFA).
5. De nuestros resultados se puede concluir que los pacientes con MG presentan alteraciones inmunológicas en la expresión de TLR de superficie en leucocitos circulantes, que aparte de ser propias de las enfermedades autoinmunes, podrían estar relacionadas y explicar en parte la patogenia de esta enfermedad.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Afifi AK. Myasthenia gravis from Thomas Willis to the present. *Neurosciences (Riyadh)*. 2005;10(1):3-13.
2. Keeseey J. Myasthenia gravis. *Arch Neurol*. 1998;55(5):745-6, doi: 10.1056/NEJMra1602678.
3. Camacho A., Esteban J., Paradas C. INFORME DE IMPACTO SOCIAL DE LA ELA Y LAS ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES. Fundación Española de Enfermedades Neurológicas. [accedido 17 noviembre 2014]. Disponible en: http://www.fundaciondelcerebro.es/docs/INFORME_ELA.pdf.
4. Meyer A., Levy Y. Chapter 33: Geoepidemiology of myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2010;9(5):A383-6, doi: 10.1016/j.autrev.2009.11.011.
5. Casetta I., Groppo E., De Gennaro R., Cesnik E., Piccolo L., Volpato S., et al. Myasthenia gravis: A changing pattern of incidence. *J Neurol*. 2010;257(12):2015-9, doi: 10.1007/s00415-010-5651-z.
6. Andersen JB., Heldal AT., Engeland A., Gilhus NE. Myasthenia gravis epidemiology in a national cohort; combining multiple disease registries. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2014;129(198):26-31, doi: 10.1111/ane.12233.
7. Aragonès JM., Bolívar I., Bonfill X., Bufill E., Mummany A., Alonso F., et al. Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology*. 2003;60(6):1024-6.
8. Gattellari M., Goumas C., Worthington JM. A national epidemiological study of Myasthenia Gravis in Australia. *Eur J Neurol*. 2012;19(11):1413-20, doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03698.x.
9. Santos E., Coutinho E., Moreira I., Silva AM., Lopes D., Costa H., et al. Epidemiology of myasthenia gravis in Northern Portugal: Frequency estimates and clinical epidemiological distribution of cases. *Muscle Nerve*. 2016;54(3):413-21, doi: 10.1002/mus.25068.
10. Pallaver F., Riviera AP., Piffer S., Ricciardi R., Roni R., Orrico D., et al. Change in myasthenia gravis epidemiology in Trento, Italy, after twenty years. *Neuroepidemiology*. 2011;36(4):282-7, doi: 10.1159/000328863.
11. Aragonès J-M., Roura-Poch P., Hernández-Ocampo EM., Alonso F., Pont-Lluelles M., Xandri I., et al. Myasthenia gravis: a disease of the very old. *J Am Geriatr Soc*. 2014;62(1):196-7.
12. Villagra-Cocco A., Villagra-Cocco P. [Prevalence of myasthenia gravis on the island of La Palma]. *Rev Neurol*. 1997;25(148):2068-9.
13. Aragonès JM., Altimiras J., Roura P., Alonso F., Bufill E., Mummany A., et al. Prevalence of myasthenia gravis in the Catalan county of Osona. *Neurologia*. s. f.;32(1):1-5, doi: 10.1016/j.nrl.2014.09.007.
14. Fagerlund MJ., Eriksson LI. Current concepts in neuromuscular transmission. *Br J Anaesth*. 2009;103(1):108-14, doi: 10.1093/bja/aep150.
15. Conti-Tronconi BM., McLane KE., Raftery MA., Grando SA., Protti MP. The nicotinic acetylcholine receptor: structure and autoimmune pathology. *Crit Rev*

- Biochem Mol Biol. 1994;29(2):69-123, doi: 10.3109/10409239409086798.
16. Levinson AI. Myasthenia gravis. En: Rich R, editor. *Clinical Immunology Principles and Practice*. 4th ed. Saunders; 2012. p. 782-92.
 17. Toyka K V., Brachman DB., Pestronk A., Kao I. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science*. 1975;190(4212):397-9.
 18. Querol L., Illa I. Myasthenia gravis and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol*. 2013;26(5):459-65, doi: 10.1097/WCO.0b013e328364c079.
 19. Tüzün E., Christadoss P. Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):904-11, doi: 10.1016/j.autrev.2013.03.003.
 20. Gilhus NE. Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*. 2016;375(26):2570-81, doi: 10.1056/NEJMra1602678.
 21. Cortés-Vicente E., Gallardo E., Martínez MÁ., Díaz-Manera J., Querol L., Rojas-García R., et al. Clinical Characteristics of Patients With Double-Seronegative Myasthenia Gravis and Antibodies to Cortactin. *JAMA Neurol*. 2016;73(9):1099-104, doi: 10.1001/jamaneurol.2016.2032.
 22. Verschuuren JJGM., Huijbers MG., Plomp JJ., Niks EH., Molenaar PC., Martinez-Martinez P., et al. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):918-23, doi: 10.1016/j.autrev.2013.03.001.
 23. Marx A., Pfister F., Schalke B., Saruhan-Direskeneli G., Melms A., Ströbel P. The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):875-84, doi: 10.1016/j.autrev.2013.03.007.
 24. Le Panse R., Berrih-Aknin S. Autoimmune myasthenia gravis: Autoantibody mechanisms and new developments on immune regulation. *Curr Opin Neurol*. 2013;26(5):569-76, doi: 10.1097/WCO.0b013e328364d6cd.
 25. Thiruppathi M., Rowin J., Li Jiang Q., Sheng JR., Prabhakar BS., Meriggioli MN. Functional defect in regulatory T cells in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1274:68-76, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06840.x.
 26. Yi JS., Guptill JT., Stathopoulos P., Nowak RJ., O'Connor KC. B cells in the pathophysiology of myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2018;57(2):172-84, doi: 10.1002/mus.25973.
 27. Maselli RA., Richman DP., Wollmann RL. Inflammation at the neuromuscular junction in myasthenia gravis. *Neurology*. 1991;41(9):1497-504.
 28. Karim MR., Zhang H-Y., Yuan J., Sun Q., Wang Y-F. Regulatory B Cells in Seropositive Myasthenia Gravis versus Healthy Controls. *Front Neurol*. 2017;8:43, doi: 10.3389/fneur.2017.00043.
 29. Yi JS., Russo MA., Massey JM., Juel V., Hobson-Webb LD., Gable K., et al. B10 Cell Frequencies and Suppressive Capacity in Myasthenia Gravis Are Associated with Disease Severity. *Front Neurol*. 2017;8:34, doi: 10.3389/fneur.2017.00034.
 30. Kang S-Y., Kang C-H., Lee K-H. B-cell-activating factor is elevated in serum of patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2016;54(6):1030-3, doi: 10.1002/mus.25162.

31. Le Panse R., Berrih-Aknin S. Immunopathogenesis of myasthenia gravis. En: Kaminski HJ, Kusner L, editores. Myasthenia gravis and Related disorders. 3.^a ed. HumanaPress; 2018. p. 43-70.
32. Preston DC., Shapiro BE. Repetitive Nerve Stimulation. Electromyography and Neuromuscular Disorders. 2013. p. 52-61.
33. Wu B., Goluszko E., Huda R., Tüzün E., Christadoss P. Experimental autoimmune myasthenia gravis in the mouse. *Curr Protoc Immunol.* 2013;Chapter 15:Unit 15.8., doi: 10.1002/0471142735.im1508s100.
34. Sun C., Zhang H., Xu J., Gao J., Qi X., Li Z. Improved methodology to obtain large quantities of correctly folded recombinant N-terminal extracellular domain of the human muscle acetylcholine receptor for inducing experimental autoimmune myasthenia gravis in rats. *Arch Med Sci.* 2014;10(2):389-95, doi: 10.5114/aoms.2013.36921.
35. Tüzün E., Huda R., Christadoss P. Complement and cytokine based therapeutic strategies in myasthenia gravis. *J Autoimmun.* 2011;37(2):136-43, doi: 10.1016/j.jaut.2011.05.006.
36. Wu X., Tuzun E., Li J., Xiao T., Saini SS., Qi H., et al. Ocular and generalized myasthenia gravis induced by human acetylcholine receptor γ subunit immunization. *Muscle Nerve.* 2012;45(2):209-16, doi: 10.1002/mus.22273.
37. Kesner VG., Oh SJ., Dimachkie MM., Barohn RJ. Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Neurol Clin.* 2018;36(2):379-94, doi: 10.1016/j.ncl.2018.01.008.
38. Kuks JBM. Clinical Presentations of Myasthenia Gravis. En: Kaminski HJ, Kusner L, editores. Myasthenia Gravis and Related Disorders. 3.^a ed. 2018. p. 85-100.
39. Teo KY., Tow SL., Haaland B., Gosavi TD., Jing-Liang L., Yew Long LO., et al. Low conversion rate of ocular to generalized myasthenia gravis in Singapore. *Muscle Nerve.* 2018;57(5):756-60, doi: 10.1002/mus.25983.
40. Aguirre F., Villa AM. Prognosis of Ocular Myasthenia Gravis in an Argentinian Population. *Eur Neurol.* 2018;79(3-4):113-7, doi: 10.1159/000487132.
41. Wang L., Zhang Y., He M. Clinical predictors for the prognosis of myasthenia gravis. *BMC Neurol.* 2017;17(1):77, doi: 10.1186/s12883-017-0857-7.
42. Sieb JP. Myasthenia gravis: an update for the clinician. *Clin Exp Immunol.* 2014;175(3):408-18, doi: 10.1111/cei.12217.
43. Wendell LC., Levine JM. Myasthenic crisis. *The Neurohospitalist.* 2011;1(1):16-22, doi: 10.1177/1941875210382918.
44. Alsheklee A., Miles JD., Katirji B., Preston DC., Kaminski HJ. Incidence and mortality rates of myasthenia gravis and myasthenic crisis in US hospitals. *Neurology.* 2009;72(18):1548-54, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181a41211.
45. Marx A., Willcox N., Leite MI., Chuang W-Y., Schalke B., Nix W., et al. Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis. *Autoimmunity.* 2010;43(5-6):413-27, doi: 10.3109/08916930903555935.
46. Spaggiari L., Casiraghi M., Guarize J. Multidisciplinary treatment of malignant thymoma. *Curr Opin Oncol.* 2012;24(2):117-22, doi: 10.1097/CCO.0b013e32834ea6bb.
47. Scorsetti M., Leo F., Trama A., D'Angelillo R., Serpico D., Macerelli M., et al. Thymoma and thymic carcinomas. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;99:332-50, doi:

- 10.1016/j.critrevonc.2016.01.012.
48. Pasnoor M., Dimachkie MM., Farmakidis C., Barohn RJ. Diagnosis of Myasthenia Gravis. *Neurol Clin.* 2018;36(2):261-74, doi: 10.1016/j.ncl.2018.01.010.
 49. Priola AM., Priola SM., Gned D., Giraudo MT., Fornari A., Veltri A. Comparison of CT and chemical-shift MRI for differentiating thymoma from non-thymomatous conditions in myasthenia gravis: value of qualitative and quantitative assessment. *Clin Radiol.* 2016;71(3):e157-69, doi: 10.1016/j.crad.2015.12.009.
 50. Priola AM., Priola SM. Imaging of thymus in myasthenia gravis: from thymic hyperplasia to thymic tumor. *Clin Radiol.* 2014;69(5):e230-45, doi: 10.1016/j.crad.2014.01.005.
 51. Sanders DB., Wolfe GI., Benatar M., Evoli A., Gilhus NE., Illa I., et al. International consensus guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary. *Neurology.* 2016;87(4):419-25, doi: 10.1212/WNL.0000000000002790.
 52. Wolfe GI., Kaminski HJ., Aban IB., Minisman G., Kuo H-C., Marx A., et al. Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. *N Engl J Med.* 2016;375(6):511-22, doi: 10.1056/NEJMoa1602489.
 53. Howard JF., Utsugisawa K., Benatar M., Murai H., Barohn RJ., Illa I., et al. Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Lancet Neurol.* 2017;16(12):976-86, doi: 10.1016/S1474-4422(17)30369-1.
 54. Anderson K V., Jürgens G., Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* 1985;42(3):779-89.
 55. Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart JM., Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996;86(6):973-83.
 56. O'Neill LAJ., Golenbock D., Bowie AG. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):453-60, doi: 10.1038/nri3446.
 57. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):135-45, doi: 10.1038/35100529.
 58. Futosi K., Fodor S., Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(3):638-50, doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.034.
 59. Koller B., Bals R., Roos D., Korting HC., Griese M., Hartl D. Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(7):535-47, doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02145.x.
 60. Oosting M., Cheng S-C., Bolscher JM., Vestering-Stenger R., Plantinga TS., Verschueren IC., et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(42):E4478-84, doi: 10.1073/pnas.1410293111.
 61. Schneberger D., Aharonson-Raz K., Singh B. Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):97-106, doi: 10.1007/s00441-010-1032-2.
 62. Kay E., Scotland RS., Whiteford JR. Toll-like receptors: Role in inflammation and

- therapeutic potential. *BioFactors*. 2014;40(3):284-94, doi: 10.1002/biof.1156.
63. Kim D., Kim YJ., Koh HS., Jang TY., Park HE., Kim JY. Reactive oxygen species enhance TLR10 expression in the human monocytic cell line THP-1. *Int J Mol Sci*. 2010;11(10):3769-82, doi: 10.3390/ijms11103769.
 64. Buchta CM., Bishop GA. Toll-like receptors and B cells: Functions and mechanisms. *Immunol Res*. 2014;59(1-3):12-22, doi: 10.1007/s12026-014-8523-2.
 65. Ma K., Li J., Fang Y., Lu L. Roles of B Cell-Intrinsic TLR Signals in Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci*. 2015, doi: 10.3390/ijms160613084.
 66. van der Vlugt LEPM., Mlejnek E., Ozir-Fazalalikhhan A., Janssen Bonas M., Dijkman TR., Labuda LA., et al. CD24^{hi} CD27⁺ B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(4):517-28, doi: 10.1111/cea.12238.
 67. Mansson A., Adner M., Cardell LO. Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: Altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir Res*. 2006;7:1-10, doi: 10.1186/1465-9921-7-36.
 68. Kaczanowska S., Joseph AM., Davila E. TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*. 2013, doi: 10.1189/jlb.1012501.
 69. Farrugia M., Baron B. The Role of Toll-Like Receptors in Autoimmune Diseases through Failure of the Self-Recognition Mechanism. *Int J Inflam*. 2017;2017:8391230, doi: 10.1155/2017/8391230.
 70. Chen Y-C., Su M-C., Liou C-W., Liu S-F., Chen C-J., Lin H-C., et al. Co-upregulation of Toll-like receptors 2 and 6 on peripheral blood cells in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*. 2015;19(3):873-82, doi: 10.1007/s11325-014-1116-4.
 71. Bell MP., Svingen P a., Rahman MK., Xiong Y., Faubion Jr. W a. Forkhead Box P3 Regulates TLR10 Expression in Human T Regulatory Cells. *J Immunol*. 2007;179(3):1893-900, doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1893.
 72. Freeman CM., Martinez FJ., Han MLK., Washko GR., McCubbrey AL., Chensue SW., et al. Lung CD8⁺ T cells in COPD have increased expression of bacterial TLRs. *Respir Res*. 2013;14(1):1-13, doi: 10.1186/1465-9921-14-13.
 73. Adib-Conquy M., Scott-Algara D., Cavillon JM., Souza-Fonseca-Guimaraes F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(3):256-62, doi: 10.1038/icb.2013.99.
 74. Lauzon NM., Mian F., MacKenzie R., Ashkar AA. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol*. 2006;241(2):102-12, doi: 10.1016/j.cellimm.2006.08.004.
 75. Cañeda-Guzmán IC., Salaiza-Suazo N., Fernández-Figueroa EA., Carrada-Figueroa G., Aguirre-García M., Becker I. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: a comparative study of TLRs and cytokines. *PLoS One*. 2014;9(11):e112410, doi: 10.1371/journal.pone.0112410.
 76. Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., de Waal Malefyt R., Kastelein RA., Bazan F., et al. Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J Exp Med*. 2001;194(6):863-70, doi: 10.1084/jem.194.6.863.

77. Dzopalic T., Rajkovic I., Dragicevic A., Colic M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res.* 2012;52(1-2):20-33, doi: 10.1007/s12026-012-8279-5.
78. Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., et al. Human TLR10 Is a Functional Receptor, Expressed by B Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells, Which Activates Gene Transcription through MyD88. *J Immunol.* 2005;174(5):2942-50, doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2942.
79. Bryant CE., Gay NJ., Heymans S., Sacre S., Schaefer L., Midwood KS. Advances in Toll-like receptor biology: Modes of activation by diverse stimuli. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(5):359-79, doi: 10.3109/10409238.2015.1033511.
80. Montero Vega MT., de Andrés Martín A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2008;36(6):347-57.
81. Giancchetti E., Fierabracci A. Gene/environment interactions in the pathogenesis of autoimmunity: new insights on the role of Toll-like receptors. *Autoimmun Rev.* 2015;14(11):971-83, doi: 10.1016/j.autrev.2015.07.006.
82. 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;36(1):121-30, doi: 10.1007/s10753-012-9526-6.
83. Bernasconi P., Barberis M., Baggi F., Passerini L., Cannone M., Arnoldi E., et al. Increased toll-like receptor 4 expression in thymus of myasthenic patients with thymitis and thymic involution. *Am J Pathol.* 2005;167(1):129-39, doi: 10.1016/S0002-9440(10)62960-4.
84. Cordiglieri C., Marolda R., Franzi S., Cappelletti C., Giardina C., Motta T., et al. Innate immunity in myasthenia gravis thymus: pathogenic effects of Toll-like receptor 4 signaling on autoimmunity. *J Autoimmun.* 2014;52:74-89, doi: 10.1016/j.jaut.2013.12.013.
85. Cavalcante P., Galbardi B., Franzi S., Marcuzzo S., Barzago C., Bonanno S., et al. Increased expression of Toll-like receptors 7 and 9 in myasthenia gravis thymus characterized by active Epstein-Barr virus infection. *Immunobiology.* 2016;221(4):516-27, doi: 10.1016/j.imbio.2015.12.007.
86. Geisse J., Caro I., Lindholm J., Golitz L., Stampone P., Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol.* 2004;50(5):722-33, doi: 10.1016/j.jaad.2003.11.066.
87. Atreya R., Bloom S., Scaldaferrri F., Gerardi V., Admyre C., Karlsson Å., et al. Clinical Effects of a Topically Applied Toll-like Receptor 9 Agonist in Active Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis.* 2016;10(11):1294-302, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw103.
88. Spaner DE., Shi Y., White D., Shaha S., He L., Masellis A., et al. A phase I/II trial of TLR-7 agonist immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2010;24(1):222-6, doi: 10.1038/leu.2009.195.
89. Fernández G., Moraga A., Cuartero MI., García-Culebras A., Peña-Martínez C., Pradillo JM., et al. TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models. *Mol Ther.* 2018, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.05.019.

90. Burns TM., Conaway M., Sanders DB. The MG Composite: A valid and reliable outcome measure for myasthenia gravis. *Neurology*. 2010;74(18):1434-40, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181dc1b1e.
91. Jaretzki A., Barohn RJ., Ernstoff RM., Kaminski HJ., Keeseey 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;55(1):16-23.
92. Hewer R., Matthews I., Chen S., McGrath V., Evans M., Roberts E., et al. A sensitive non-isotopic assay for acetylcholine receptor autoantibodies. *Clin Chim Acta*. 2006;364(1-2):159-66, doi: 10.1016/j.cccn.2005.05.035.
93. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2008.
94. Cavallo T., Granholm NA. Lipopolysaccharide from gram-negative bacteria enhances polyclonal B cell activation and exacerbates nephritis in MRL/lpr mice. *Clin Exp Immunol*. 1990;82(3):515-21.
95. Yoshino S., Sasatomi E., Ohsawa M. Bacterial lipopolysaccharide acts as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice. *Immunology*. 2000;99(4):607-14.
96. Abedi-Valugerdi M., Nilsson C., Zargari A., Gharibdoost F., DePierre JW., Hassan M. Bacterial lipopolysaccharide both renders resistant mice susceptible to mercury-induced autoimmunity and exacerbates such autoimmunity in susceptible mice. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(2):238-47, doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02849.x.
97. Lu M., Munford R. LPS stimulates IgM production in vivo without help from non-B cells. *Innate Immun*. 2016;22(5):307-15, doi: 10.1177/1753425916644675.
98. Kobayashi F., Watanabe E., Nakagawa Y., Yamanishi S., Norose Y., Fukunaga Y., et al. Production of autoantibodies by murine B-1a cells stimulated with *Helicobacter pylori* urease through toll-like receptor 2 signaling. *Infect Immun*. 2011;79(12):4791-801, doi: 10.1128/IAI.05808-11.
99. Zhang X., Ding R., Zhou Y., Zhu R., Liu W., Jin L., et al. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4-dependent activation of B cells by a polysaccharide from marine fungus *Phoma herbarum* YS4108. *PLoS One*. 2013;8(3):e60781, doi: 10.1371/journal.pone.0060781.
100. Pone EJ., Lou Z., Lam T., Greenberg ML., Wang R., Xu Z., et al. B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination: modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses. *Autoimmunity*. 2015;48(1):1-12, doi: 10.3109/08916934.2014.993027.
101. Wong CK., Wong PTY., Tam LS., Li EK., Chen DP., Lam CWK. Activation profile of Toll-like receptors of peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2010;159(1):11-22, doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.04036.x.
102. Noronha AM., Liang Y., Hetzel JT., Hasturk H., Kantarci A., Stucchi A., et al. Hyperactivated B cells in human inflammatory bowel disease. *J Leukoc Biol*. 2009;86(4):1007-16, doi: 10.1189/jlb.0309203.
103. McDonnell M., Liang Y., Noronha A., Coukos J., Kasper DL., Farraye FA., et al.

- Systemic toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):298-307, doi: 10.1002/ibd.21424.
104. Lun SWM., Wong CK., Ko FWS., Hui DSC., Lam CWK. Expression and functional analysis of toll-like receptors of peripheral blood cells in asthmatic patients: Implication for immunopathological mechanism in asthma. *J Clin Immunol.* 2009;29(3):330-42, doi: 10.1007/s10875-008-9269-1.
 105. Cheng S., Wang H., Zhou H. The Role of TLR4 on B Cell Activation and Anti- β 2GPI Antibody Production in the Antiphospholipid Syndrome. *J Immunol Res.* 2016;2016:1719720, doi: 10.1155/2016/1719720.
 106. Hayashi EA., Granato A., Paiva LS., Bertho AL., Bellio M., Nobrega A. TLR4 promotes B cell maturation: independence and cooperation with B lymphocyte-activating factor. *J Immunol.* 2010;184(9):4662-72, doi: 10.4049/jimmunol.0903253.
 107. Lim S-G., Kim J-K., Suk K., Lee W-H. Crosstalk between signals initiated from TLR4 and cell surface BAFF results in synergistic induction of proinflammatory mediators in THP-1 cells. *Sci Rep.* 2017;7:45826, doi: 10.1038/srep45826.
 108. Stewart CR., Stuart LM., Wilkinson K., van Gils JM., Deng J., Halle A., et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 2010;11(2):155-61, doi: 10.1038/ni.1836.
 109. Won W-J., Bachmann MF., Kearney JF. CD36 is differentially expressed on B cell subsets during development and in responses to antigen. *J Immunol.* 2008;180(1):230-7.
 110. Rinaldi E., Consonni A., Guidesi E., Elli M., Mantegazza R., Baggi F. Gut microbiota and probiotics: novel immune system modulators in myasthenia gravis? *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1413(1):49-58, doi: 10.1111/nyas.13567.
 111. Richard A., Corvol J-C., Debs R., Reach P., Tahiri K., Carpentier W., et al. Transcriptome Analysis of Peripheral Blood in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy Patients Identifies TNFR1 and TLR Pathways in the IVIg Response. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(19):e3370, doi: 10.1097/MD.0000000000003370.
 112. Mortazavi SH., Amin R., Alyasin S., Kashef S., Karimi MH., Babaei M., et al. Down-regulation of TLR2, 3, 9 and Signaling Mediators, MyD88 and TRIF, Gene Transcript Levels in Patients with Kawasaki Disease Treated with IVIG. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2015;14(2):188-97.
 113. Moretta L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood.* 2010;116(19):3689-91, doi: 10.1182/blood-2010-09-303057.
 114. Popko K., Górska E. The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases. *Cent J Immunol.* 2015;40(4):470-6, doi: 10.5114/ceji.2015.56971.
 115. Kanevskiy LM., Telford WG., Sapozhnikov AM., Kovalenko EI. Lipopolysaccharide induces IFN- γ production in human NK cells. *Front Immunol.* 2013;4:11, doi: 10.3389/fimmu.2013.00011.
 116. Shimoda S., Harada K., Nihiro H., Shirabe K., Taketomi A., Maehara Y., et al. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2011;53(4):1270-81, doi: 10.1002/hep.24194.

117. Tadema H., Abdulahad WH., Stegeman CA., Kallenberg CGM., Heeringa P. Increased expression of Toll-like receptors by monocytes and natural killer cells in ANCA-associated vasculitis. *PLoS One*. 2011;6(9):e24315, doi: 10.1371/journal.pone.0024315.
118. Souza-Fonseca-Guimaraes F., Parlato M., Philippart F., Misset B., Cavaillon J-M., Adib-Conquy M., et al. Toll-like receptors expression and interferon- γ production by NK cells in human sepsis. *Crit Care*. 2012;16(5):R206, doi: 10.1186/cc11838.
119. Suzuki Y., Onodera H., Tago H., Saito R., Ohuchi M., Shimizu M., et al. Altered populations of natural killer cell and natural killer T cell subclasses in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2005;167(1-2):186-9, doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.06.015.
120. Chien PJ., Yeh JH., Chiu HC., Hsueh YM., Chen CT., Chen MC., et al. Inhibition of peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in patients with myasthenia gravis treated with plasmapheresis. *Eur J Neurol*. 2011;18(11):1350-7, doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03424.x.
121. Chong WP., Ling MT., Liu Y., Caspi RR., Wong WM., Wu W., et al. Essential role of NK cells in IgG therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2013;8(4):e60862, doi: 10.1371/journal.pone.0060862.
122. Shi FD., Wang HB., Li H., Hong S., Taniguchi M., Link H., et al. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol*. 2000;1(3):245-51, doi: 10.1038/79792.

CRÉDITOS DE LAS ILUSTRACIONES

Todas las figuras e ilustraciones de este trabajo son creaciones originales del autor de la tesis. Para la Figura 2 el paciente otorgó su consentimiento para ser fotografiado. Las representaciones tridimensionales de los TLR que se muestran en las figuras 3, 4 y 5 fueron modeladas por el autor de esta tesis utilizando los programas VMD (UNIVERSITY OF ILLINOIS AT URBANA-CHAMPAIGN) y Protein Workshop (Protein Data Bank) a partir de los datos cristalográficos publicados y disponibles en:

Ohnishi H., Tochio H., Kato Z., Orii KE., Li A., Kimura T., et al. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(25):10260-5, doi: 10.1073/pnas.0812956106.

Park BS., Song DH., Kim HM., Choi B-S., Lee H., Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009;458(7242):1191-5, doi: 10.1038/nature07830

ANEXOS

ANEXOS

Clasificación de los timomas de la OMS:

Tipo	Denominación	Características	Riesgo
A	Timoma medular	Compuesto de células epiteliales tímicas neoplásicas con forma de huso u ovals, carecen de atipia nuclear o están acompañadas de linfocitos no neoplásicos	Bajo
AB	Timoma mixto	Focos con características de timoma tipo A mezclados con focos ricos en linfocitos no neoplásicos	Bajo
B1	Timoma predominantemente cortical	Células de apariencia casi indistinguible de aquellas de la corteza tímica normal, con áreas que se asemejan a la médula tímica	Bajo
B2	Timoma cortical	El componente epitelial neoplásico contiene células rollizas dispersas con núcleos vesiculares y nucléolos diferenciados entre una población muy numerosa de linfocitos no neoplásicos	Alto
B3	Carcinoma tímico bien diferenciado	Principalmente compuesto de células epiteliales de forma redonda o poligonal, y no presenta atipia o presenta atipia leve	Alto
C	Carcinoma tímico	Atipia citológica clara y un conjunto de características citológicas no específicas del timo, similares a las características citológicas de los carcinomas de otros órganos	Alto

Clasificación de los timomas según Masaoka

Estadio	Extensión
I	Tumor encapsulado sin invasión capsular microscópica
II	Invasión macroscópica del tejido adiposo circundante o pleura mediastínica. Invasión microscópica de la cápsula
III	Invasión macroscópica de los órganos vecinos
IVa	Metástasis pleurales o pericárdicas
IVb	Metástasis linfáticas o hematógenas

ÍNDICE ANALÍTICO

A

acetilcolinesterasa, 14, 30, 34, 35

ácido úrico, 14, 40

ADN, 14, 40

adyuvante de Freund, 30

agonista, 45, 47, 79

anticuerpos anti β_2 -glicoproteína, 80

antiLRP4, 34

antiMuSK, 24, 32, 34

APRIL, 26

aptámeros, 47

artritis autoinmune, 79

artritis reumatoide, 45

asma, 80

azatioprina, 36, 62

B

BAFF, 26, 80

bulbar, 31

C

CCL17, 46

CCL21, 26

CCL22, 46

CD36, 80

células mioides, 25, 26

células presentadoras de antígenos, 25

centros germinales, 24, 25, 26, 46

ciclofosfamida, 36

ciclosporina, 36

cirrosis biliar primaria, 83

citometría, 15, 50, 57, 58, 87

citometría de flujo, 15, 50, 57, 87

citómetro, 57

class switch, 79

colitis ulcerosa, 47, 80

complemento, 24, 25, 26, 28, 37

conmutación de clase, 79

cortactina, 24

corticoides, 36, 46

crisis colinérgicas, 35

crisis miasténica, 33, 36, 88

criterios de inclusión, 52

CXCL12, 26

CXCL13, 26

D

DAMP, 38

defensinas, 15, 40

diplopia, 31

disartria, 31, 32

dominio TIR, 39

Drosophyla melanogaster, 38

E

eculizumab, 37
edrofonio, 34
electromiografía de fibra única, 34
enfermedad de Behçet, 45
Enfermedad de Crohn, 80
enfermedad inflamatoria intestinal, 80, 81
esclerosis múltiple, 45, 84
España, 22
estimulación nerviosa repetitiva, 28, 34, 52

F

factor de necrosis tumoral, 80
factor de seguridad, 29
fatigabilidad, 21, 31, 32
flagelina, 14, 40
FOXP3, 27

G

granzimas, 82

H

hendidura sináptica, 23, 28
hiperplasia tímica, 25, 27, 46, 83
HMGB-1, 40, 45

I

IFN- α , 83
IFN- γ , 82, 84
imiquimod, 47

incidencia, 22
inmunoglobulinas intravenosas, 36, 62, 81
inmunopatogenia, 25, 82
inmunosupresor, 16, 33, 35, 36, 50
inmunosupresores, 33, 36, 37, 62
IRF, 41
IVIG, 62, 63, 84

J

jitter, 34, 52

L

LDL oxidada, 14, 40, 80
ligando, 41, 80
LPS, 14, 38, 40, 41, 79, 81, 82, 88
LRP4, 24
lupus, 79, 80, 81
lupus eritematoso sistémico, 79, 80

M

MD-2, 41
Mestinón, 35
metotrexate, 36
MGFA, 18, 35, 53, 63, 77, 90
MHC-I, 26, 82
MHC-II, 26
micofenolato de mofetilo, 36
modelos animales, 30
mortalidad, 33
MyD88, 41

O

oftalmoparesia, 31

oftalmoplejía, 31

P

PAMP, 38

PBMC, 45

piridostigmina, 35

placa motora, 23, 28

placa muscular, 23, 27, 29

plasmaféresis, 36, 83

PLEX, 62, 63

polisacáridos, 14, 40

potasio, 23

potencial de acción, 23, 28

potencial de acción muscular, 23, 28

potenciales de placa, 23

premio Nobel, 38

prevalencia, 22

priming, 26

proteína beta amiloide, 81

proteínas del choque térmico, 15, 40

PRR, 37

ptosis, 31, 32

ptosis palpebral, 31

R

repeticiones de leucina, 39

resonancia magnética, 34

rituximab, 36

S

sarcolema, 23

síndrome de Eaton-Lambert, 31

sodio, 23

T

tacrolimus, 36, 62

test del hielo, 32

TGF- β , 45

timectomía, 14, 18, 35, 36, 62, 63, 83

timo, 24, 25, 26, 27, 33, 34, 46, 81, 82, 104

timoma, 18, 25, 33, 34, 36, 37, 46, 50, 62, 63, 77, 83,
90, 104

TIR, 41

Toll/IL-1 receptor domain, 39

tomografía computarizada, 34

transcripción, 41, 81

transmembrana, 39

transmisión neuromuscular, 23, 24, 27, 28, 32, 33,
34, 52

TRIF, 41

V

virus de Epstein-Barr, 46

Z

zona tolerogénica, 25