

A. Evoli • E. Bartoccioni

Anticorpi nella miastenia gravis

Riassunto Gli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina (AChR) sono dosabili nel 85% dei pazienti con miastenia gravis (MG) generalizzata e nel 50% dei casi con sintomi puramente oculari. Sono IgG policlonali, appartenenti prevalentemente alle sottoclassi IgG1 e IgG3, che esercitano la loro azione patogena mediante lisi focale complemento-mediata e modulazione antigenica. L'alterazione della tolleranza che conduce alla produzione degli anticorpi anti-AChR è probabilmente differente nelle diverse patologie timiche associate alla MG (iperplasia e timoma) e ciò spiega le diverse risposte anticorpali e cliniche alla timectomia. Nei pazienti con MG generalizzata AChR-negativa sono presenti, con frequenza variabile dal 26% al 47%, IgG contro il recettore protein-chinasi muscolo-specifico MuSK. I meccanismi d'azione di tali anticorpi, costituiti prevalentemente da IgG4, non sono ancora chiari. Essi appaiono associati a ristretti fenotipi clinici, caratterizzati, fra l'altro, da assenza di anomalie timiche. Nella MG associata a timoma

e, meno frequentemente, nella MG ad esordio tardivo sono presenti anticorpi contro antigeni muscolari (anti-titina ed anti-recettore della rianodina) ed anti-citochine (IFN α ed IL-12), il cui significato patogenetico è in discussione.

Parole chiave Miastenia gravis • AChR • Iperplasia timica • Timoma • MuSK

Introduzione

La miastenia gravis (MG) è una delle malattie autoimmuni meglio conosciute, in cui sia la struttura dell'antigene, il recettore nicotinico dell'acetilcolina (AChR), che i meccanismi d'azione delle IgG patogene sono noti in dettaglio. Per oltre 20 anni il dosaggio degli anticorpi anti-AChR (AChR-Ab) ha costituito il test diagnostico più specifico per la MG e l'uso di Ig prelevate dal siero dei pazienti ha consentito di realizzare modelli sperimentali di malattia.

Miastenia con anticorpi anti-AChR

Nella maggioranza dei soggetti miastenici l'antigene è rappresentato dall'AChR ed il disturbo della trasmissione neuro-muscolare è secondario ad una marcata perdita di recettori associata a distruzione della membrana postsinaptica dove si riscontrano depositi di IgG e complemento. L'AChR è un canale ionico semiselettivo per i cationi, costituito da 5 subunità omologhe, $\alpha(2)\beta\gamma\delta$ nel recettore fetale e $\alpha(2)\beta\epsilon\delta$ nel recettore adulto. Ciascuna subunità è costituita da un ampio dominio N-terminale extracellulare, 4 regioni idrofobiche transmembrana-niche (M1–M4), un *loop* citoplasmatico ed un dominio C-terminale extracellulare [1]. Gli AChR-Ab sono IgG policlonali, appartenenti prevalentemente alle sottoclassi IgG1 e IgG3, che ricono-

A. Evoli (✉)
Dipartimento di Neuroscienze
Università Cattolica
L.go F. Vito 1, I-00168 Roma, Italia
e-mail: a.evoli@rm.unicatt.it

E. Bartoccioni
Istituto di Patologia Generale
Università Cattolica, Roma, Italia

scono l'antigene nella conformazione nativa. La loro azione patogena si realizza attraverso 2 principali meccanismi: lisi complemento-mediata della membrana post-sinaptica e "modulazione antigenica", responsabile di un'accelerata degradazione recettoriale; anticorpi in grado di inibire il legame con l'ACh, pur frequentemente presenti, hanno scarso significato patogenetico [2]. Sia nella patologia umana che nella MG sperimentale autoimmune (EAMG), circa il 50% degli anticorpi sierici anti-AChR sono diretti contro la cosiddetta *main immunogenic region* (MIR), localizzata nel dominio extracellulare dell' α subunità, che include la sequenza 66–76 ed è distinta dal sito di legame per l'ACh. La struttura e la posizione della MIR rendono conto dei meccanismi d'azione delle IgG specifiche [1].

La produzione di AChR-Ab richiede la presenza di citochine prodotte da linfociti T CD4⁺ AChR-specifici ed il trasferimento di queste cellule induce la EAMG [2]. Tuttavia, dal momento che linfociti T CD4⁺ che riconoscono autoantigeni sono presenti nel repertorio immunologico di soggetti normali, è chiaro che la loro presenza non è sufficiente a determinare l'insorgenza della MG. Ciò che causa l'alterazione della tolleranza con attivazione dei T linfociti e produzione di anticorpi non è noto. È dimostrata, tuttavia, l'esistenza di un processo di *antigen-spreading* – a livello di linfociti T e B – che può essere favorito, in soggetti geneticamente predisposti, da un'alterazione del *pattern* di citochine e dei meccanismi immunoregolatori [2, 3].

Le alterazioni del timo solitamente associate a MG (iperplasia e timoma) potrebbero avere un ruolo distinto nella produzione di AChR-Ab. Nella forma di malattia ad esordio precoce (*early-onset MG* – EOMG) è tipico il riscontro di iperplasia follicolare timica, caratterizzata da un'espansione dello spazio perivascolare con presenza di infiltrati linfocitari e follicoli linfatici con centri germinativi (GC). Il timo iperplastico è considerato un probabile sito di immunizzazione nei confronti dell'AChR e di produzione di anticorpi specifici. Non solo le cellule mioidi esprimono l'AChR, ma mRNA della subunità α è presente nelle cellule epiteliali timiche (TEC) sia in soggetti normali che nei pazienti miastenici [4]. La presentazione di epitopi lineari potrebbe avvenire ad opera delle TEC della midollare timica, in un alterato contesto di citochine che favorirebbe l'attivazione dei T linfociti e la produzione di anticorpi, anche se inizialmente in misura limitata e contro epitopi non rilevanti. Tali anticorpi reagirebbero contro l'AChR nativo delle cellule mioidi, il cui danno indurrebbe il reclutamento di APC professionali ed il rilascio di complessi antigene-anticorpo, con secondaria formazione di GC [4], che, com'è noto, sono sede di maturazione dei B linfociti e di selezione di anticorpi ad alta affinità. In accordo con tale ipotesi patogenetica, l'asportazione di un timo iperplastico si associa a riduzione del tasso sierico di AChR-Ab ed a miglioramento del quadro clinico.

La presenza di un timoma si osserva nel 10% circa dei pazienti; gli istotipi tumorali associati a miastenia sono

quelli dotati della capacità di supportare la maturazione dei linfociti T. Il timo neoplastico non esprime l'AChR e non produce anticorpi specifici, tuttavia è in grado di esportare linfociti T maturi CD4⁺ e CD8⁺, che possono essere stati sensibilizzati contro subunità dell'AChR espresse dalle TEC tumorali [5]. Nei pazienti con timoma, la produzione di AChR-Ab avverrebbe negli organi linfatici periferici, il che è in accordo con la mancata riduzione del tasso sierico anticorpale dopo la timectomia [5].

Con il comune RIA, gli anticorpi anti-AChR risultano dosabili nel 85% dei soggetti con MG generalizzata e nel 50% dei casi di miastenia oculare. Sono pressoché costantemente presenti nella MG associata a timoma e titoli anticorpali medio-elevati si riscontrano nei pazienti con alterazioni timiche sia di tipo iperplastico che neoplastico. Al contrario, bassi livelli anticorpali caratterizzano sia la miastenia oculare che le forme ad esordio tardivo (*late-onset MG*-LOMG).

Nella miastenia oculare ed, in generale, nei casi con basso titolo di AChR-Ab, in cui possono essere presenti anticorpi diretti contro il recettore di tipo adulto, la sensibilità del test può essere migliorata dall'uso di linee cellulari transfettate che esprimono la subunità ϵ [6]. La situazione opposta, costituita dall'esclusiva presenza di IgG dirette contro il recettore di tipo fetale, è stata osservata in donne, senza sintomi clinici di MG, che hanno partorito neonati affetti da artrogriposi multipla congenita [7].

Miastenia AChR-negativa

Nel 15% dei pazienti con MG generalizzata il dosaggio dell'AChR-Ab risulta persistentemente negativo. Questa forma clinica è stata definita miastenia sieronegativa, ma appare più corretto definirla "AChR-negativa", dal momento che sono presenti altri autoanticorpi sierici che, almeno per una parte di pazienti, sono stati identificati.

Nel 2001, Hoch et al. [8] hanno evidenziato, in questi pazienti, anticorpi sierici diretti contro la porzione extracellulare del recettore tirosin-chinasico muscolo-specifico MuSK. Questa osservazione è stata confermata anche dalla nostra esperienza [9] e, attualmente, il dosaggio degli anticorpi anti-MuSK (MuSK-Ab) fa parte della diagnostica clinica di MG. MuSK è una proteina transmembranica postsinaptica che lega sia l'agrina che la rapsina ed ha un ruolo cruciale nella formazione dei clusters di AChR durante lo sviluppo della giunzione neuromuscolare [10]. La frequenza dei MuSK-Ab varia dal 26% al 47% dei casi di miastenia generalizzata AChR-negativa; sono invece assenti nella MG AChR-positiva e nella miastenia oculare. La presenza di tali anticorpi si associa a due principali fenotipi clinici, uno, più frequente, caratterizzato da prevalenti disturbi bulbari e frequenti crisi respiratorie, l'altro con deficit circoscritti ai muscoli estensori del collo e del

Tabella 1 Forme cliniche di miastenia generalizzata

Caratteristiche	AChR-positiva (85%)			AChR-negativa	
	Esordio precoce	Associata a timoma	Esordio tardivo	MuSK+ (7%)	MuSK - (8%)
Età di esordio	<40 anni	40–60 anni	>40 anni	–	–
M:F	1:3	1:1	1,5:1	1:3,2	1:1,5
Patologia timica	Iperplasia	Timomi AB,B	No	No	No (rara iperplasia)
MHC	B8, DR3, DQ2	No	B7, DR2	?	?
Ab anti-titina	Rari	70–90%	>50%	–	–
Ab anti-RyR	Rari	50–75%	30–40%	–	–
Ab anti-IFN α , -IL12	Rari	70% e 50%	30%	–	–

cingolo scapolare. Diversamente da quando si osserva nella forma classica di MG, sono assenti, in questi pazienti, alterazioni del timo e la timectomia sembra indurre scarso beneficio.

Il meccanismo d'azione dei MuSK-Ab, che appartengono prevalentemente alla sottoclasse IgG4 [11], non è ancora definito. Lo studio di Hoch et al. [8] dimostrava che i sieri dei pazienti con anticorpi anti-MuSK provocavano in vitro un'inibizione dei clusters di AChR indotti dall'agrina. Studi successivi su biopsie muscolari di soggetti MuSK-positivi hanno evidenziato una sostanziale normalità del numero di AChR con modesti ed incostanti depositi postsinaptici di IgG, associati tuttavia a marcata riduzione di ampiezza dei MEPP [12, 13].

Nella MG AChR-negativa è stata inoltre descritta la presenza di fattori sierici non-IgG in grado di ridurre la funzione dell'AChR in cellule TE671, che agiscono probabilmente attivando la fosforilazione del recettore e favorendone la desensibilizzazione [7].

Altri anticorpi nella MG

È noto che il tasso sierico di AChR-Ab non correla con la gravità del deficit miastenici. Ciò può essere dovuto all'eterogeneità antigenica degli anticorpi o alla presenza di una risposta immune contro altri antigeni muscolari il cui danno potrebbe contribuire alla sintomatologia.

Dagli anni '60 era stata osservata la presenza, nella MG, di anticorpi anti-muscolo striato che, successivamente, sono stati identificati come anticorpi anti-titina, proteina del muscolo striato e cardiaco che ha un ruolo rilevante nel determinare la struttura del sarcomero [14]. Gli anticorpi anti-titina sono prevalentemente diretti contro una MIR della proteina, definita MGT-30 (*myasthenia gravis titin 30 kDa*). Sono presenti nel 70–90% dei pazienti con timoma ed in oltre il 50% dei casi con esordio dopo i 60 anni, indipendentemente dalla patologia timica; sono stati

inoltre associati alla “miosite” che si osserva in alcuni casi di MG associata a timoma [15].

Il recettore della rianodina (RyR) è una proteina transmembranica del reticolo sarcoplasmatico, coinvolta nel rilascio di Ca²⁺ che è associato alla contrazione muscolare [16]. Anticorpi anti-RyR sono evidenziabili nel 50–75% dei pazienti miastenici portatori di timoma e nel 30–40% dei soggetti con LOMG; sono generalmente considerati un *marker* di forme cliniche gravi e potrebbero avere un ruolo patogenetico nelle cardiopatie talora associate a MG e timoma [15].

Dal momento che sia gli anticorpi anti-titina che gli anti-RyR sono diretti contro antigeni intracellulari, il loro reale valore patogeno è in discussione. Attualmente, essi vengono prevalentemente utilizzati quali *marker* della presenza di timoma; in tale impiego, il loro valore diagnostico è maggiore in pazienti con esordio della MG in età giovanile.

Anticorpi anti-IFN α ed anti-IL12 sono presenti nella MG associata a timoma, rispettivamente nel 70% e nel 50% circa dei casi; essi inoltre risultano presenti nel 30% dei casi con LOMG [7]. Il significato di questi anticorpi, che neutralizzano citochine favorenti risposte di tipo Th1, non è ancora definito; nel processo di auto-sensibilizzazione è stato ipotizzato il ruolo di cellule dendritiche intratimiche [17]. Poiché la produzione di anticorpi anti-IFN α ed anti-IL12 avviene all'interno del timoma, un incremento del loro tasso sierico è considerato un *marker* precoce di recidiva tumorale.

La presenza delle diverse specificità anticorpali permette attualmente di distinguere differenti forme cliniche di MG generalizzata (Tabella 1).

Bibliografia

1. Lindstrom JM (2003) Nicotinic acetylcholine receptors in muscles and nerves. Comparison of their structure, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N Y Acad Sci* 998:41–52

2. Vincent A (2003) Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol* 2:797–804
3. Maloy KJ, Powrie F (2001) Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2:816–822
4. Shiono H, Roxanis I, Zhang W et al (2003) Scenarios for autoimmunization of T and B cells in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 998:237–256
5. Strobel P, Helmreich M, Menioudakis G et al (2002) Paraneoplastic myasthenia gravis correlates with generation of mature naive CD4(+) T cells in thymomas. *Blood* 100:159–166
6. Beeson D, Jacobson L, Newsom-Davis J et al (1996) A transfected human muscle cell line expressing the adult subtype of the human acetylcholine receptor for diagnostic assay in myasthenia gravis. *Neurology* 47:1552–1555
7. Vincent A, McConville J, Farrugia ME et al (2003) Antibodies in myasthenia gravis and related disorders. *Ann N Y Acad Sci* 998:324–335
8. Hoch W, McConville J, Helms S et al (2001) Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 7:365–368
9. Scuderi F, Marino M, Colonna L et al (2002) Anti-p110 autoantibodies identify a subtype of “seronegative” myasthenia gravis with prominent oculobulbar involvement. *Lab Invest* 82:1139–1146
10. Burden SJ (2002) Building the vertebrate neuromuscular synapse. *J Neurobiol* 53:501–511
11. McConville J, Farrugia ME, Beeson D et al (2004) Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 55:580–584
12. Selcen D, Fukuda T, Shen X-M et al (2004) Do anti-MuSK antibodies cause myasthenic symptoms? *Neurology* 62:183
13. Shiraishi H, Motomura M, Fukuda T et al (2004) Autoantibodies to MuSK in Japanese patients with myasthenia gravis: Pathophysiology of the biopsied neuromuscular junctions. *Neurology* 62:184
14. Granzier HL, Labeit S (2004) The giant protein titin. A major player in myocardial mechanisms, signaling, disease. *Circ Res* 94:284–295
15. Skeie G, Romi F, Aarli JA et al (2003) Pathogenesis of myositis and myasthenia associated with titin and ryanodine receptor antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 998:343–350
16. Coronado R, Morrisette J, Sukhareva M et al (1994) Structure and function of ryanodine receptor. *Am J Physiol* 266:1485–1504
17. Meager A, Wadhwa M, Dilger P et al (2003) Anti-cytokine autoantibodies: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 132:128–136