

ARTÍCULO ORIGINAL

Nueva prueba diagnóstica para autoanticuerpos en Miastenia Gravis basado en un sistema de micropartículas fluorescentes libre de células

Paz, Mariela Laura^{1,2}; Manuelli, Paula Natalia¹; González Maglio, Daniel Horacio^{1,2}; Aguirre, Florencia³; Villa, Andrés³; Leoni, Juliana²; Barrantes, Francisco José.⁴

¹Laboratorio de Inmunología Básica, Aplicada y Patológica, Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.

²CONICET-Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.

³Sección de Neuroinmunología y Electrofisiología, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, CABA, Argentina.

⁴Laboratorio de Neurobiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, UCA-CONICET, CABA, Argentina.

Dirección de correspondencia: marielaurapaz@gmail.com

Resumen

Introducción: Se ha desarrollado una novedosa prueba diagnóstica para la detección de autoanticuerpos en pacientes con miastenia gravis. Este nuevo método, libre de células, es relativamente simple y consume menos tiempo y materiales que el radioinmunoensayo estándar, método de referencia utilizado actualmente en la clínica. **Materiales y métodos:** La prueba consiste en el uso de micropartículas de poliestireno recubiertas con el receptor de acetilcolina (se probaron dos fuentes de receptor de diferente origen), marcación específica del receptor con ligandos fluorescentes de alta afinidad (α -bungarotoxina-AlexaFluor o anticuerpos anti-receptor policlonales provenientes de los sueros de pacientes diagnosticados con la enfermedad, seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos), y detección por citometría de flujo. **Resultados:** Los valores de intensidad de fluorescencia media para los sueros positivos por la técnica de referencia *versus* un pool de sueros humanos normales: mostraron una diferencia estadísticamente significativa para los dos tipos de micropartículas sensibilizadas utilizadas. **Conclusión:** Las dos estrategias diferentes evaluadas fueron exitosas para la detección de autoanticuerpos en el suero de pacientes con miastenia gravis. Adicionalmente esta prueba tiene el potencial para distinguir entre las distintas formas de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina, y los resultados podrían correlacionarse con la severidad de la miastenia gravis, pudiendo resultar un elemento predictivo de gran utilidad en el seguimiento de la evolución clínica de la enfermedad.

Palabras clave: receptor de acetilcolina, anticuerpos anti-receptor de acetilcolina, citometría de flujo, micropartículas, miastenia gravis.

Abstract

Introduction: A new diagnostic test for the detection of autoantibodies for myasthenia gravis was developed. The new cell-free test is relatively simple and less time- and material-consuming than the standard radioimmunoassay-based methodologies in current clinical practice. **Materials and methods:** The test involves the use of polystyrene microbeads coated with the nicotinic acetylcholine receptor protein (two different sources of the receptor were tested), specific labeling of the protein with high-affinity fluorescent ligands (AlexaFluor- α -bungarotoxin or polyclonal anti-receptor antibodies from sera of already diagnosed patients, followed by secondary fluorescent-labeled antibodies), and detection by fluorescence flow cytometry. **Results:** mean fluorescence intensity for positive sera *versus* a pool of human normal sera: showed statistically significant differences for the two receptor's source types used. **Conclusion:** The two different approaches tested were successful for the detection of autoantibodies in sera from patients with myasthenia gravis. The new test has the potentiality to distinguish between different autoantibody isoforms and subtypes, and the results may be correlated with the severity of myasthenia. The test may be eventually applied to predict the clinical evolution of this pathology.

Key words: acetylcholine receptor, anti-acetylcholine receptor autoantibodies, flow cytometry, microbeads, myasthenia gravis.

Introducción

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad autoinmune mediada por autoanticuerpos patogénicos (ACRA) dirigidos contra el receptor acetilcolina nicotínico (nAChR), la cual se manifiesta clínicamente con debilidad muscular [1,2]. La técnica actual de referencia para detectar ACRA es el radioinmunoensayo (RIA), un método costoso y nocivo para el medioambiente. Se han realizado intentos para sustituir al RIA con ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), pero, hasta el momento, no se ha podido alcanzar la alta sensibilidad que posee el RIA [3,4].

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un método alternativo, simple y ecológicamente amigable, para la medición de ACRA. La metodología se basa en la inmovilización del nAChR en partículas de poliestireno, su interacción con sondas fluorescentes y su detección por citometría de flujo.

El nAChR es un canal iónico pentamérico regulado por ligando con dos isoformas: la neuronal y la muscular. La última está conformada por tres cadenas diferentes (β , δ , γ o ϵ) y dos cadenas α idénticas, las cuales poseen el sitio de unión a los ligandos [5]. El ligando natural del receptor es la acetilcolina, pero las subunidades alfa pueden también unir antagonistas, como la neurotoxina altamente específica derivada de un veneno de víbora, denominada α -bungarotoxina (BTX) [6,7]. Los pacientes con MG poseen autoanticuerpos anti-receptor de acetilcolina (ACRA) que son los marcadores serológicos de la enfermedad [1]. Existen tres tipos de ACRA: de unión, bloqueantes y moduladores. Los primeros pueden unirse a cualquier sitio del receptor, los segundos se unen al sitio de unión a ligandos en la interface de la subunidad α con una subunidad no- α , y el tercer tipo no sólo es capaz de unirse al nAChR, sino que además desencadena su internalización y reciclado [8].

El objetivo a largo plazo de este desarrollo es poder detectar de manera simultánea y en un mismo ensayo los ACRA de unión y bloqueantes, utilizando sondas fluorescentes con diferente longitud de onda de emisión para distinguirlos.

Materiales y Métodos

Pacientes

Las muestras de suero de pacientes y de voluntarios sanos se obtuvieron del Servicio de Neuroinmunología del Hospital Ramos Mejía, Consultorio de Miastenia Gravis, Buenos Aires, Argentina. Todos los estudios se llevaron a cabo bajo un protocolo aprobado por el Comité de Ética de dicho Hospital y todas las muestras se obtuvieron con un consentimiento informado firmado por los individuos involucrados. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los estándares éticos declarados en el Código de Ética de la Declaración de Helsinki de 1964.

Sensibilización de micropartículas

El primer paso del procedimiento de esta nueva técnica analítica consistió en recubrir (sensibilizar) la superficie de micropartículas de poliestireno de 4 μm (Spherotech, Inc) con el nAChR ($70 \mu\text{g} / 100 \text{cm}^2$ de micropartículas). Dos

fuentes diferentes de receptor fueron evaluadas: nAChR del órgano eléctrico de *Torpedo californica* (Tc, Aquatic Research Consultants) purificado por cromatografía de afinidad [9,10]; y nAChR de un extracto de músculo bovino (Bm) purificado por cromatografía de intercambio iónico [11,12].

Para la preparación de las micropartículas sensibilizadas se mezclaron 1,4 μl de micropartículas de poliestireno (1 cm^2 o 2×10^6 partículas) con 2,3 μl de nAChR de Tc (0,6 μg) o 1 μl de Bm (0,7 μg), en un volumen final de 20 μl en buffer isotónico salino (IBS) (2,3 mM NaH_2PO_4 ; 14,2 mM Na_2HPO_4 ; 140 mM NaCl; 3,8 mM KCl), y se incubaron durante 16 hs a 4 °C en un agitador orbital. La mezcla luego fue centrifugada a 5.000 x g por 10 min y el sobrenadante fue descartado. El pellet fue resuspendido en 20 μl de IBS-BSA (0,5 % p/v seroalbúmina bovina en IBS) y la suspensión incubada por 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital, con el objetivo de bloquear todos los sitios libres no sensibilizados con el receptor. La preparación fue centrifugada a 5.000 x g por 10 min nuevamente, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 20 μl de IBS (resultando en una suspensión de 1×10^5 micropartículas-nAChR por μl). La suspensión se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Microscopía de Fluorescencia

Cubreobjetos de vidrio de 15 mm No. 1,5 fueron limpiados intensamente y secados [13]. Luego los mismos fueron recubiertos con una solución de polilisina (0,1 mg/mL) por 5 min a temperatura ambiente y el exceso de solución se dejó escurrir y secar totalmente.

Las micropartículas (1×10^4) sensibilizadas con nAChR de Tc o músculo bovino respectivamente, fueron colocadas sobre los cubreobjetos recubiertos con polilisina, permitiendo su inmovilización durante 16 hs a 4 °C. Todas las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda. Los cubreobjetos fueron luego lavados e incubados con los siguientes ligandos fluorescentes por 1h a temperatura ambiente: i) α -BTX-AlexaFluor⁴⁸⁸ (1 μM , Invitrogen), ii) α -BTX-AlexaFluor⁵⁵⁵ (1 μM , Invitrogen) y iii) un suero ACRA positivo de un paciente diagnosticado con MG, como anticuerpo primario (suero A, 1:100, valor ACRA por RIA 3,71 nmoles/l). En el último caso fueron realizados dos lavados con buffer fosfato salino (PBS) antes del agregado del anticuerpo secundario anti-IgG humanas-FITC (1:200, Bethyl), con 1 h de incubación a temperatura ambiente en oscuridad. Luego de dos lavados más con PBS. Los cubreobjetos se montaron en cámaras de perfusión especialmente diseñadas, se agregó PBS y finalmente la fluorescencia fue observada en un microscopio de epifluorescencia hecho a medida. Este microscopio fue construido por uno de los grupos de trabajo (F.J. Barrantes), y funciona actualmente en el laboratorio de Neurobiología Molecular a su cargo. Dicho microscopio, el primero de su tipo en el país, opera en epifluorescencia de campo ancho, microscopía estocástica de molécula única (STORM) y de fotoactivación (PALM) en super-resolución. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un objetivo de inmersión 100

X de 1,49 N.A. [Nikon] bajo una iluminación con diodos de emisión de luz (LED) [Tolket, Argentina], utilizando el paquete de software de imágenes SlideBook [Intelligent Imaging Innovations].

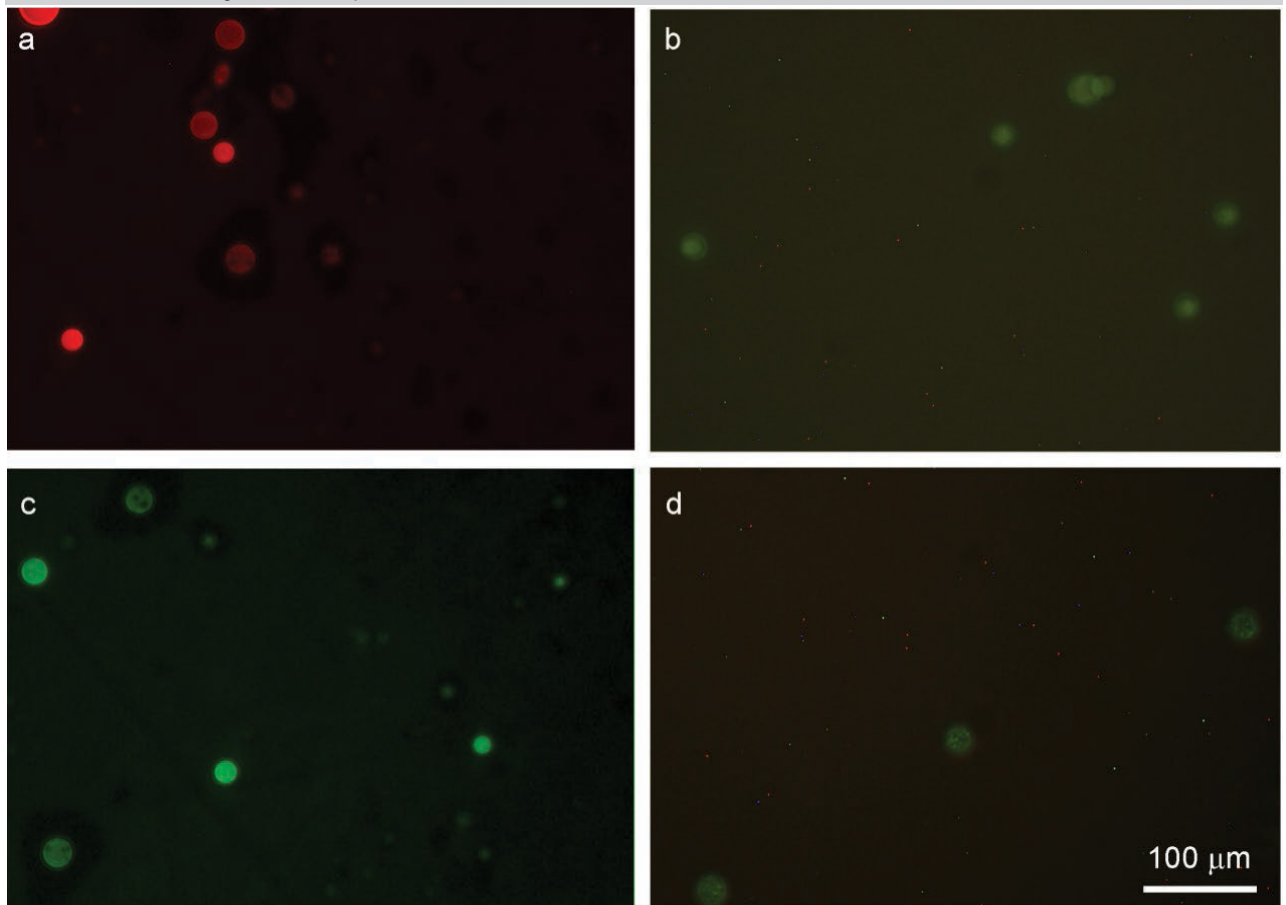
Citometría de Flujo

En otra serie de experimentos, las micropartículas sensibilizadas con nAChR de Tc o músculo bovino respectivamente, fueron marcadas en solución y sometidas a una citometría de flujo utilizando un citómetro PAS III PARTEC. Brevemente, cada tubo conteniendo 1×10^5 micropartículas sensibilizadas fue incubado con α -BTX-AlexaFluor⁴⁸⁸ [1 μ M] o diferentes sueros humanos normales (SHN, 1:50) o diferentes sueros ACRA + [1:50] y anticuerpos secundarios-FITC [1:100]. Debe mencionarse que los sueros ACRA + evaluados de pacientes con MG (n = 5, A a E) fueron previamente valorados por RIA, y clasificados como ACRA + (> 0,5 nmol/l). Lo mismo se realizó para las muestras de SHN (n = 5), que resultaron ser todas negativas por RIA (< 0,1 nmol/l) y luego, también, por citometría de flujo. Posteriormente, se juntaron alícuotas de cada uno de ellos para conformar un *pool* negativo, para su uso futuro y se le midió nuevamente su valor de ACRA por RIA, resultando también negativo (< 0,1 nmol/L).

Para el ensayo de citometría de flujo, 1 μ l de las micropar-

tículas de poliestireno sensibilizadas se mezclaron con el volumen apropiado de cada sonda fluorescente primaria y se incubaron durante 16 hs a 4 ° C en un agitador orbital en un volumen final de 50 μ l. Después, las suspensiones fueron lavadas dos veces con PBS utilizando un equipo que consta de placas de 96 pocillos y su correspondiente sistema de vacío [MultiScreenHTS, Millipore]. Cada suspensión - muestra se coloca en un pocillo, donde cada pocillo posee un filtro de PVDF de 0,45 μ m, a continuación se aplica vacío, eliminándose de este modo la porción líquida de la suspensión y quedando retenidas las micropartículas. De este modo pueden realizarse varios lavados de manera muy sencilla y rápida, evitando los pasos de centrifugación con su consecuente pérdida de material. Las micropartículas fueron resuspendidas adicionando 20 μ l de PBS a cada pocillo y luego incubadas con los anticuerpos secundarios por 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital [100 rpm], en el caso que correspondiese. Las micropartículas fueron lavadas tres veces con PBS, resuspendidas en 100 μ l de PBS y sometidas a la citometría de flujo. Alrededor de 20.000 eventos se registraron para cada condición. La Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) fue calculada para cada muestra [incluyendo el control de autofluorescencia, conteniendo sólo micropartículas sensibilizadas sin marcar].

Figura 1. Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando las micropartículas sensibilizadas con nAChR-Tc, incubadas con a) α -BTX-AlexaFluor⁵⁵⁵ y c) suero del paciente A con MG, ACRA+. Las micropartículas sensibilizadas con nAChR-Bm, incubadas con b) α -BTX-AlexaFluor⁴⁸⁸ y d) suero del paciente A con MG, ACRA+.



Análisis Estadístico

Los datos de citometría de flujo fueron analizados con el software FlowJo. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad-Instat, y los gráficos de barras con GraphPad-Prism. Para comparar grupos se aplicó un ANOVA unidireccional con post-test de Tukey. Los resultados se encuentran expresados como la media \pm desvío estándar de tres ensayos independientes.

Resultados

Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran que las micropartículas se sensibilizaron eficazmente con los dos tipos de nAChR, ya que ambos tipos de receptores pudieron ser reconocidos por la α -BTX marcada con fluorocromo, así como también por los ACRA presentes en el suero del paciente A con MG (Figura 1).

Cuando los SHN fueron evaluados por citometría de flujo ($n = 5$) con los dos tipos de partículas sensibilizadas, su IFM resultó muy similar entre ellos, y con señales inferiores a las muestras positivas (Figura 2).

El *pool* conformado por los cinco SHN se usó luego como control negativo, siendo su valor de ACRA por la técnica de referencia también negativo [$< 0,1$ nmol/l]. El control de unión inespecífica del anticuerpo secundario anti-IgG humanas conjugado con FITC a las partículas sensibilizadas, arrojó un valor de IFM similar al del control de autofluorescencia (datos no mostrados).

Los análisis de las citometrías de flujo muestran resultados positivos para los dos tipos de micropartículas sensibilizadas. Para Tc, IFM: autofluorescencia vs BTX ($p < 0,05$), SHN vs sueros C, D, E ($p < 0,001$) A, B ($p < 0,05$). Para Bm, IFM: AF vs BTX ($p < 0,01$), SHN vs sueros A, C, D ($p < 0,001$) E ($p < 0,01$) B ($p < 0,05$) (Figura 3).

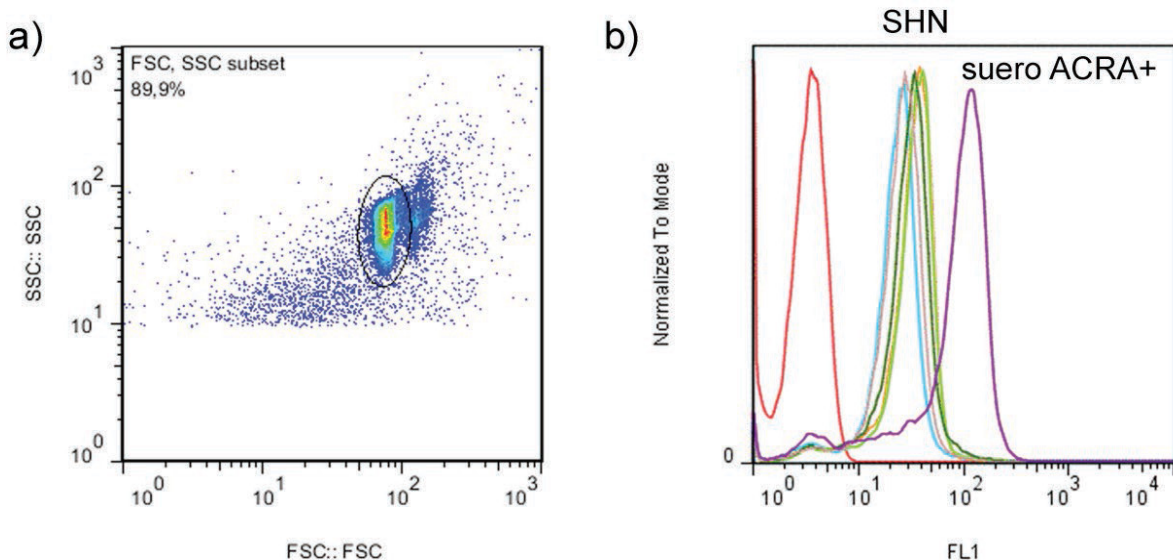
Discusión

Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia con las micropartículas sensibilizadas y marcadas con las diferentes sondas confirman que ambos tipos de receptor, provenientes de distintas fuentes biológicas (órgano eléctrico y músculo esquelético), se han adherido a la superficie de las micropartículas de poliestireno. La microscopía se realizó de manera cualitativa para estimar el estado de sensibilización de las micropartículas, ya que la cuantificación puede realizarse de manera exitosa y automática en el citómetro de flujo. Los resultados fueron positivos, corroborados por el hecho de que las micropartículas sensibilizadas con Tc y Bm pudieron ser reconocidas no sólo por un suero ACRA+, sino también por diferentes α -BTXs marcadas con distintos fluorocromos.

El análisis cuantitativo realizado por citometría de flujo muestra que los sueros de diferentes pacientes con MG ACRA+ fueron capaces de reconocer las micropartículas sensibilizadas con nAChR, proveniente tanto de órgano eléctrico como de músculo esquelético. Cuando las micropartículas sensibilizadas fueron incubadas con sueros humanos normales, también pudo detectarse una fluorescencia mayor al valor del control de autofluorescencia, pero menor a las señales positivas. Esta observación es muy común cuando se trabaja con sueros humanos, debido a las interacciones inespecíficas que suelen ocurrir. Estos sueros utilizados como controles negativos fueron también negativos por la técnica de referencia [$< 0,1$ nmol/l].

Los sueros utilizados como muestras positivas fueron confirmados también por RIA, observándose valores positivos de entre 1,1 y 82 nmol/l [$> 0,50$ nmol/l se considera positivo].

Figura 2. Citometría de flujo de micropartículas sensibilizadas con nAChR-Bm. a) Gráfico de puntos que muestra la selección de la población de micropartículas individuales sobre las que se mide posteriormente la IFM. b) Histograma que muestra la detección de fluorescencia en el canal FL1 para FITC. Las micropartículas se incubaron con diferentes sueros humanos normales ($n = 5$, SHN) y un suero del paciente C con MG, ACRA+, seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con FITC.



Cuando se analizó la correlación entre la IFM, obtenida con los dos tipos de micropartículas sensibilizadas y los valores de ACRA por RIA, no se pudo establecer una correlación estadísticamente significativa. Como estos ensayos son los primeros realizados para la evaluación de esta nueva metodología, se asume que deben ensayarse más sueros para validar el método, y para verificar si hay una real correlación entre las dos técnicas.

El objetivo final del trabajo es detectar de manera simultánea los dos tipos de ACRA (de unión y bloqueantes) y, luego, transferir la técnica a los centros de salud. Esto podría ser beneficioso especialmente en un país como la Argentina, donde actualmente en la clínica no se discrimina el tipo de ACRA que se mide y los médicos sólo son informados sobre el estado ACRA positivo o negativo de los pacientes.

Metodologías alternativas evaluadas previamente para detectar ACRA por citometría de flujo consistieron en el uso de células viables [14,15]. El uso de células viables en una técnica para el uso diario en la clínica tiene muchas limitaciones, incluyendo las dificultades en la estandarización. Esto se debe a variaciones entre lotes de células por causa de diferentes condiciones de cultivo; la necesidad de un cultivo viable inmediatamente previo al procedimiento diagnóstico, el cual puede demorar hasta una semana si el trabajo comienza con un vial congelado de un banco de células; y finalmente la impracticabilidad de controles de calidad inter-laboratorios para validar los resultados. Todas estas desventajas pueden obviarse utilizando métodos alternativos que no dependan del uso de células viables, como el que se propone en el presente trabajo.

Esta nueva prueba diagnóstica libre de células ha sido exitosa en la detección de autoanticuerpos en sueros de diferentes pacientes con MG, los cuales fueron positivos

por la técnica de referencia. Los dos tipos de preparaciones del receptor, provenientes de diferentes fuentes biológicas utilizadas para sensibilizar las micropartículas, fueron igualmente reconocidas por las sondas fluorescentes que se usaron, incluyendo los autoanticuerpos.

Este método está todavía en proceso de desarrollo y es necesario ensayar más sueros para corroborar totalmente su validez y reproducibilidad, calcular los parámetros de especificidad y sensibilidad, y establecer una correlación con la técnica de referencia.

La aplicación de la metodología alternativa aquí descrita podría facilitar la correlación entre los títulos ACRA y los subtipos ACRA con la gravedad de la enfermedad. Esto, a su vez, podría utilizarse para predecir la evolución clínica de la patología y, eventualmente, junto con otros biomarcadores que reflejen el comportamiento clínico de la MG, resultar en un manejo terapéutico más apropiado de esta enfermedad.

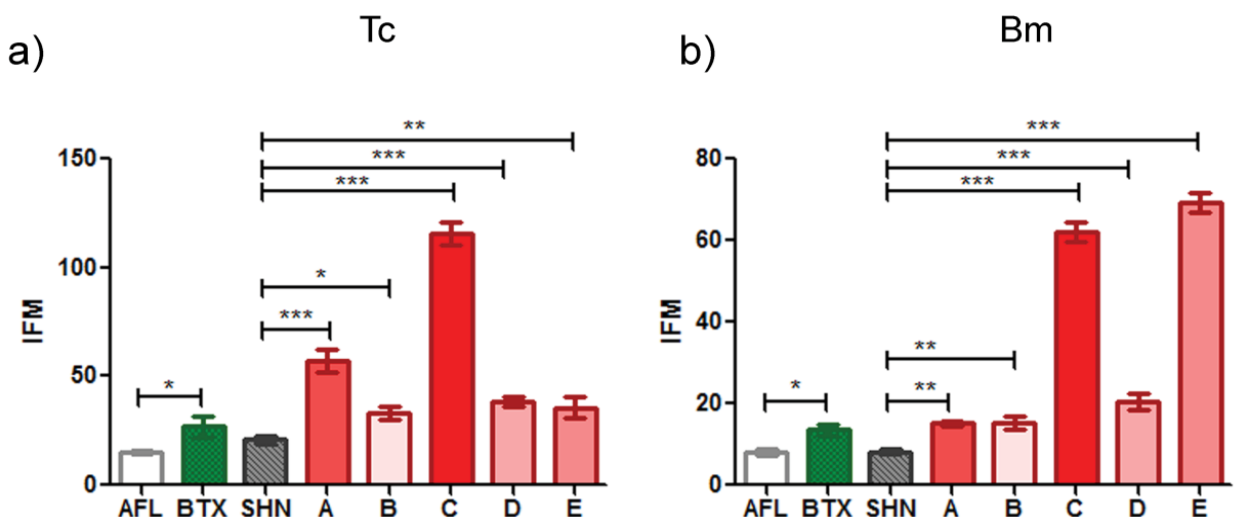
Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por un subsidio de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT20020150200007BA subsidio 2016-2018) a M.L.P. y los subsidios PIP 11220150100858 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Argentina (CONICET) y PICT 2011-0604 del MinCyT a F.J.B.

Referencias bibliográficas

1. Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology* 1976;26(11):1054–1054.
2. Berrih-Aknin S, Frenkian-Cuvelier M, Eymard B. Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gra-

Figura 3. Citometría de flujo de micropartículas sensibilizadas con nAChR purificado de a) Torpedo californica (Tc) y b) músculo bovino (Bm). El gráfico de barras muestra la IFM y el análisis estadístico: ANOVA unidireccional con post-test de Tukey, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Las micropartículas se incubaron con: PBS (control de autofluorescencia -AFL), α -BTX-AlexaFluor⁴⁸⁸ (BTX), pool de suero humano normal (SHN), diferentes sueros de pacientes con MG, ACRA + (A a E).



- vis. *Journal of Autoimmunity* 2014;48–49:143–8.
3. Franciotta D, Martino G, Brambilla E, Zardini E, Locatelli V, Bergami A, Tinelli C, Desina G, Cosi V. TE671 cell-based ELISA for anti-acetylcholine receptor antibody determination in myasthenia gravis. *Clin Chem.* 1999;45(3):400-5.
 4. Dwyer DS, Bradley RJ, Urquhart CK, Kearney JF. An enzyme-linked immunoabsorbent assay for measuring antibodies against muscle acetylcholine receptor. *Journal of immunological methods* 1983;57(1–3):111–9.
 5. Barrantes FJ. Recent developments in the structure and function of the acetylcholine receptor. *International review of neurobiology* 1983;24:259–341.
 6. Changeux JP, Kasai M, Lee CY. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1970;67(3):1241–7.
 7. Vincent A, Jacobson L, Curran L. Alfa-Bungarotoxin binding to human muscle acetylcholine receptor: Measurement of affinity, delineation of AChR subunit residues crucial to binding, and protection of AChR function by synthetic peptides. *Neurochemistry International* 1998;32(5–6):427–33.
 8. Howard F, Lennon V, Finley J, Matsumoto J, Elveback L. Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1987;505:526–38.
 9. Bermúdez V, Antollini SS, Fernández Nieves G a, Aveldaño MI, Barrantes FJ. Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstitution. *Journal of lipid research* 2010;51(9):2629–41.
 10. Nieves GAF, Barrantes FJ, Antollini SS. Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Conformational State by Free Fatty Acids and Steroids. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283(31):21478–86.
 11. Ferrero B, Aimò G, Pagni R, Bergamasco B, Bongioanni MR, Bergamini L, Durelli L. Modified and improved anti-acetylcholine receptor (AChR) antibody assay: comparison of analytical and clinical performance with conventional anti-AChR antibody assay. *Clin Chem.* 1997;43(5):824-31.
 12. Wu JT, Miya TG, Knight JA, Bringhurst C. Acetylcholine receptors from normal human muscle: concentration, purification, and use in radioreceptor assays for autoantibodies. *Journal of clinical laboratory analysis* 1991;5(2):79–85.
 13. Barrantes FJ. Single-Molecule Localization Super-Resolution Microscopy of Synaptic Proteins. In: Shukla A, editor. *Membrane Proteins: Chemical and Synthetic Approaches*, Springer Protocols Handbooks. Springer Science+Business Media; 2016. p. 1–42.
 14. Lozier BK, Haven TR, Astill ME, Hill HR. Detection of Acetylcholine Receptor Modulating Antibodies by Flow Cytometry. *American Journal of Clinical Pathology* 2015;143(2):186–92.
 15. Cromar A, Lozier BK, Haven TR, Hill HR. Detection of Acetylcholine Receptor Blocking Antibodies by Flow Cytometry. *American journal of clinical pathology* 2016;145(1):81–5.