



TESIS DOCTORAL

**“NUEVAS REACTIVIDADES ANTIGÉNICAS
EN NEUROPATÍAS INMUNOMEDIADAS”**

DOCTORANDO

Luis Antonio Querol Gutiérrez

DIRECTORA

Isabel Illa Sendra

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

2013



TESIS DOCTORAL

**“NUEVAS REACTIVIDADES ANTIGÉNICAS
EN NEUROPATÍAS INMUNOMEDIADAS”**

DOCTORANDO

Luis Antonio Querol Gutiérrez

DIRECTORA

Isabel Illa Sendra

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

2013

A Josefina

A mis padres, Camino y Luis

A Pablo

AGRADECIMIENTOS

A Isabel, por enseñarme que cuidar de un paciente no es sólo intentar darle soluciones inmediatas, sino también esperanzas para el futuro. Por transmitirme que esas esperanzas dependen no sólo de nuestro trabajo diario sino también de nuestra actitud ante la enfermedad, nuestro compromiso con la ciencia y de su translación a la sociedad. Finalmente, por ayudarme a entender que ni un médico ni un científico dejan de serlo al salir del hospital o del laboratorio, lo son, para lo bueno y lo malo, en todo momento y en todo lugar.

A Gisela, por su espíritu positivo, integrador y amable. Porque es indispensable en el laboratorio y por ayudarme decisivamente a sacar la tesis adelante. También por las horas de especulación y fantasía inmunológica hasta altas horas de la tarde.

A Eugenia, Fina y Miquel, porque fueron los cimientos de la tesis, por sus cientos de horas de ayuda y colaboración, horas de ratas, cerebros, nervios y células.

A Toni Escartín, por permitirme hacer lo que me gusta, ayudarme en todo momento, enseñarme Neurología siempre de buen humor y por sacar tiempo y ganas de dónde no las hay para ver pacientes sin parar con la ilusión del primer día.

A Xavi y Bárbara, por estar siempre dispuestos a ayudar, a enseñarme cosas, a discutir resultados y a compartir mis interminables cuentos de la lechera. Y porque hacen una labor crucial por el grupo: sacarnos de fiesta.

A Ricard y Jordi, porque yo esperaba compañeros y encontré sabios maestros amigos.

A Edu y Noemí porque son el dardo en el experimento, la intuición científica, el trabajo incansable y la generosidad hecha investigador. Por sus consejos clave en momentos de atasco y desesperación.

A Aida y Alba por su alegría y dedicación, porque tratan a los pacientes con delicadeza y humanidad que es una forma muy difícil de hacer las cosas bien.

A Anna, Sonia y Esther, por su disposición, eficiencia y generosidad.

A Alex y Sergi (y a Jordi, por segunda vez), porque no pude tener mejores Neurólogos de resis mayores. Por los cafés, las charlas, las cenas, el fútbol y las agujetas de reirme.

A Nuria y Mariana por entender a los pacientes mejor que nadie y ayudarme a entenderlos mejor yo también.

To Kevin, for feeding my passion on microscopic armies. For giving me a year of pure science, good conversation and 3 Michelin star-dinners.

To Jae-Yun, for being my conversation buddy.

To Arundhati, LJ and Pam, for sharing bench hours (that is like sharing trench). For letting me travel like never before without leaving the lab.

A mis R grandes y pequeños, porque hacer la residencia entre amigos hace que todo sea mucho más fácil.

A los Adjuntos y al Director del Servicio de Neurología, por buscar siempre la excelencia, empezando por la formación que han proporcionado y me siguen proporcionando.

A Carlos Lopez-Otín, por encender la mecha.

A Maria y Natalia, mis familias, los lomos y mis amigos de Morella, Hontoria y Oviedo por ser soporte imprescindible en el colegio, la carrera, la residencia, los malos momentos, la distancia, la tesis...la vida.

A los pacientes, por enseñarme a valorar lo importantes que son los detalles, las pequeñas cosas del día a día. Por ayudarnos a andar pequeños pasitos que ojalá algún día marquen un camino que ellos puedan recorrer.

ÍNDICE

1. RESUMEN DE LA TESIS

1.1. RESUMEN EN INGLÉS

1.2. RESUMEN EN CASTELLANO

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El nervio periférico

2.1.1. Estructura

2.1.2. El nodo de Ranvier: Estructura, dominios funcionales e importancia en la conducción nerviosa

2.1.3. Inmunología del nervio periférico

2.1.3.1. Inmunidad celular

2.1.3.2. Inmunidad humoral

2.1.3.2.1. Autoanticuerpos

2.1.3.2.2. El papel de los autoanticuerpos como biomarcadores

2.1.3.3. Funciones inmunes de las células de Schwann

2.2. Neuropatías autoinmunes

2.2.1. Introducción

2.2.2. Características clínicas de las neuropatías autoinmunes

2.2.2.1. Síndrome de Guillain-Barre y variantes

2.2.2.1.1. Poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (AIDP)

2.2.2.1.2. Formas axonales: Neuropatía axonal motora aguda (AMAN) y neuropatía axonal sensitivo-motora aguda (AMSAN)

2.2.2.1.3. Variantes atáxicas

2.2.2.1.4. Variantes loco-regionales

2.2.2.2. Neuropatías autoinmunes crónicas

2.2.2.2.1. Poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica
(CIDP) y variantes

2.2.2.2.2. Neuropatías asociadas a gammapatía monoclonal

2.2.2.2.3. Neuropatía motora multifocal

2.2.3. Fisiopatología del SGB y la CIDP

2.2.3.1. Fisiopatología del Síndrome de Guillain-Barre

2.2.3.1.1. Histopatología

2.2.3.1.2. Autoanticuerpos y mímica molecular

2.2.3.1.2.1. Anticuerpos antigangliósido

2.2.3.2. Fisiopatología de la CIDP

2.2.3.2.1. Histopatología

2.2.3.2.2. Inmunidad celular

2.2.3.2.3. Inmunidad humoral

2.2.3.2.3.1. Anticuerpos contra proteínas de la mielina

2.2.3.2.3.2. Anticuerpos contra axón y estructuras del nodo de Ranvier

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. RESULTADOS

4.1. ARTÍCULO I: Clinical and serological features of acute sensory ataxic neuropathy with antiganglioside antibodies.

4.2. ARTÍCULO II: Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

5. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ARTÍCULO I.

5.1.1. Síntesis resultados

5.1.2. Relevancia

5.2. ARTÍCULO II.

5.2.1.Síntesis resultados

5.2.2.Relevancia

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN DE LA TESIS

1.1. RESUMEN EN INGLÉS

The description of clinical-immunological correlations in autoimmune diseases is of paramount importance to characterize disease phenotypes, diagnostic and prognostic subgroups and to choose therapies depending on the immunological profile of patients.

Inflammatory neuropathies constitute a group of infrequent diseases of the peripheral nerves of presumed autoimmune pathogenesis. It includes acute neuropathies such as Guillain-Barré syndrome (GBS) and chronic neuropathies such as chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP). In all of them it has been postulated a prominent role of autoantibodies in their pathogenesis. However, the antigenic reactivities and the pathogenic mechanisms of these diseases remain largely unknown.

Clinical and serological features of acute sensory ataxic neuropathy with antiganglioside antibodies. Ricard Rojas-García MD PhD, Luis Querol MD, Eduard Gallardo PhD, Noemí De Luna Salvá PhD, Cándido Juárez PhD, Mercedes Garces MD, Eva Fages MD, Carlos Casasnovas MD, Isabel Illa MD PhD. *J Peripher Nerv Syst.* 2012 Jun;17(2):158-68

GBS is a post-infectious acute neuropathy in which antibodies against gangliosides play an important role. There are various phenotypes of GBS, including sensory-motor, ataxic, sensory-ataxic and loco-regional variants. Each variant has been associated to different antiganglioside antibody patterns. Miller-Fisher syndrome (MFS) is a GBS variant characterized by ataxia, areflexia and opthalmoparesis. It associates with antiganglioside antibodies bearing the NeuNAcNeuNAcGal epitope, such as GQ1b and GT1a. In ataxic GBS patients present with ataxia and negative

Romberg sign and there is no apparent opthalmoparesis. It is also associated to GQ1b antibodies. On the other hand, a pure sensory form of GBS associated to GD1b antibodies known as acute sensory-ataxic neuropathy (ASAN) can also present with ataxia of peripheral origin. Distinguishing ASAN, MFS and ataxic GBS can be difficult from a clinical perspective. Moreover, demyelinating features, a diagnostic criteria in sensory GBS, are usually absent in ASAN and the inclusion of this form in the GBS spectrum is controversial. We designed a study to describe the clinical and immunological features of ASAN. All patients from a database including sera sent for routine antiganglioside-antibody testing and fulfilling ASAN criteria were collected and their epidemiological, clinical and electrophysiological features analyzed. Of 12 patients fulfilling criteria for ASAN, 7 had antibodies against gangliosides bearing disialosyl epitopes (GQ1b, GD2, GD3, GD1b). All ASAN patients with positive disialosyl antibodies presented with gait unsteadiness and sensory symptoms and reported an upper respiratory tract infection before disease onset. Five of the 7 patients presented eyelid ptosis. All patients had a good recovery with IVIg treatment or spontaneously.

CONCLUSION: Considering these features we concluded that ASAN is, in fact, a GBS variant, and constitutes a specific phenotype different from ataxic GBS or MFS.

Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

Luis Querol MD, Gisela Nogales-Gadea PhD, Ricard Rojas-Garcia MD PhD, Eugenia Martinez-Hernandez MD, Jordi Diaz-Manera MD, Xavier Suarez-Calvet MSc, Miquel Navas, Josefa Araque RPN, Eduard Gallardo PhD and Isabel Illa MD PhD. *Ann Neurol.* 2013 Mar;73(3):370-80

CIDP is a chronic inflammatory neuropathy in which antibodies are thought to play an important role. Antibodies against myelin proteins had been described using ELISA

and western-blot assays, but results were not reproduced in cell-based assays preserving protein conformation and none proved useful as biomarker. Recently, studies on sural nerve biopsies of CIDP patients have shown disorganization of node of Ranvier and the search of autoantibodies focused on proteins of the node of Ranvier. We used an unbiased approach with neuron immunocytochemistry, immunoprecipitation and confirmation of relevant antigens with transfected cells to find autoantibodies that could be useful in everyday practice. Starting with 46 well-characterized CIDP patients we found 7 patients reacting against neurons. Two patients precipitated contactin-1 (CNTN1) and one CNTN1 and contactin-associated protein-1 (CASPR1). Reactivity was confirmed with immunocytochemistry, immunohistochemistry and absorption studies. None of the 104 controls tested positive. All three patients shared old age, aggressive onset, motor predominance, prominent axonal degeneration at onset and poor response to IVIg. These features identify a subgroup of CIDP with homogeneous phenotype.

CONCLUSION: Anti-CNTN1 antibodies are the first biomarker identified in CIDP with diagnostic, prognostic and therapeutic implications.

GENERAL CONCLUSION: These results strengthen the idea that autoimmune neuropathies are a very heterogeneous group of diseases in which autoantibody discovery and the definition of clinical-immunological correlations can have diagnostic, prognostic and therapeutic implications

1.2. RESUMEN EN CASTELLANO

La descripción de correlaciones clínico-inmunológicas en las enfermedades autoinmunes es importante para caracterizar distintos fenotipos dentro de una enfermedad, establecer grupos diagnósticos y pronósticos y para escoger las terapias en función del perfil inmunológico de cada paciente.

Las neuropatías inflamatorias constituyen un grupo de enfermedades raras del sistema nervioso periférico de probable etiología autoinmune. Este grupo incluye neuropatías agudas como el síndrome de Guillain-Barré (SGB) y neuropatías crónicas como la Poliradiculoneuropatía Inflamatoria Desmielinizante Crónica (CIDP). En todas ellas ha sido propuesto un papel prominente de los autoanticuerpos en su patogenia. Sin embargo, las reactividades antigénicas y los mecanismos patogénicos de estas enfermedades son desconocidos en su mayor parte.

Clinical and serological features of acute sensory ataxic neuropathy with

antiganglioside antibodies. Ricard Rojas-García MD PhD, Luis Querol MD, Eduard Gallardo PhD, Noemí De Luna Salvá PhD, Cándido Juárez PhD, Mercedes Garces MD, Eva Fages MD, Carlos Casasnovas MD, Isabel Illa MD PhD. *J Peripher Nerv Syst.* 2012 Jun;17(2):158-68

El SGB es una neuropatía aguda post-infecciosa en la que los anticuerpos antigangliósido juegan un papel importante. Existen diversos fenotipos dentro del SGB, incluyendo variantes sensitivo-motoras, atáxicas, sensitivas y variantes loco-regionales. Cada variante ha sido asociada a diferentes patrones de reactividad antigangliósido. El síndrome de Miller-Fisher (SMF) es una variante de SGB caracterizada por la presencia de ataxia, arreflexia y oftalmoparesia. Se asocia con la presencia de anticuerpos dirigidos contra gangliósidos que contienen el epítipo NeuNAcNeuNAcGal, como GQ1b y GT1a. En el SGB atáxico los pacientes presentan ataxia con signo de Romberg negativo y sin oftalmoparesia aparente. También se asocia a anticuerpos contra GQ1b. Por otro lado una forma sensitiva pura de SGB asociada a anticuerpos contra GD1b y conocida como neuropatía aguda sensitivo-atáxica (ASAN) puede presentarse también con ataxia de origen periférico. Distinguir el ASAN del SMF o el SGB atáxico puede ser difícil desde el punto de vista clínico. Además, la presencia de desmielinización, un criterio diagnóstico en el SGB sensitivo, es rara en

ASAN y , por tanto, es controvertida su inclusión como variante de SGB. Considerando lo anterior, diseñamos un estudio para describir las características clínica e inmunológicas del ASAN. Todos los pacientes incluidos en una base de datos conteniendo los resultados de test rutinarios de anticuerpos antigangliósido y que cumplían criterios de ASAN fueron analizados en cuanto a sus características epidemiológicas, clínicas, electrofisiológicas y de reactividad anti-gangliósido. De los 12 pacientes que cumplían criterios en primer lugar, siete presentaban anticuerpos contra gangliósidos con epítipo disialosil (GQ1b, GD1b, GD2, GD3). Todos los pacientes con anticuerpos contra disialosil comenzaron con síntomas sensitivos e inestabilidad de la marcha y manifestaban haber presentado una infección de vías respiratorias altas en los días previos. Cinco de los 7 pacientes presentaron ptosis palpebral. Todos ellos tuvieron un buen pronóstico, bien tras tratamiento con IVIg o bien espontáneamente.

CONCLUSIÓN: Teniendo en cuenta lo anterior concluimos que el ASAN es, de hecho, una variante del SGB y que constituye un síndrome diferente al SMF o el SGB atáxico.

Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

Luis Querol MD, Gisela Nogales-Gadea PhD, Ricard Rojas-Garcia MD PhD, Eugenia Martinez-Hernandez MD, Jordi Diaz-Manera MD, Xavier Suarez-Calvet MSc, Miquel Navas, Josefa Araque RPN, Eduard Gallardo PhD and Isabel Illa MD PhD. *Ann Neurol.* 2013 Mar;73(3):370-80

La CIDP es una neuropatía crónica autoinmune en la que se ha propuesto un papel importante en su patogenia de los autoanticuerpos. En estudios previos habían sido descritos anticuerpos contra proteínas de la mielina mediante ELISA o western-blot, pero los resultados no se reprodujeron usando ensayos basados en células que mantuvieran la conformación de la proteína sin desnaturalizar y ninguno de esos

autoanticuerpos se demostró útil como biomarcador. Más recientemente el descubrimiento en biopsias del nervio sural de pacientes con CIDP de que la estructura del nodo de Ranvier está desorganizada ha llevado a buscar antígenos candidatos en el nodo de Ranvier y estructuras relacionadas. Nosotros, usando una aproximación no sesgada, diseñamos un estudio que utilizaba técnicas de inmunocitoquímica en neuronas, inmunoprecipitación y confirmación de antígenos en células transfectadas para tratar de encontrar autoanticuerpos que pudieran servir de biomarcadores en la práctica clínica diaria.

De 46 pacientes con una CIDP bien caracterizada, encontramos 7 que reaccionaban contra neuronas. Dos de estos pacientes precipitaron la proteína contactin-1 (CNTN1) y otro precipitó CNTN1 y contactin-associated protein-1 (CASPR1). La reactividad contra dichas proteínas fue confirmada con inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y experimentos de absorción. Ninguno de los 104 controles fue positivo. Los tres pacientes que reaccionaban contra CNTN1 compartían un fenotipo específico que incluía avanzada edad, inicio agresivo, predominio motor, degeneración axonal marcada de inicio y respuesta pobre a las IVIg. Estas características clínicas definen un subgrupo de CIDP con fenotipo homogéneo.

CONCLUSIÓN: Por tanto, los anticuerpos contra CNTN1 son el primer biomarcador con utilidad clínica identificado en CIDP.

CONCLUSIÓN GENERAL: En resumen, estos resultados refuerzan la noción de que las neuropatías autoinmunes constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades en las que la descripción de autoanticuerpos y sus correlatos clínicos puede tener importantes implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El nervio periférico

El sistema nervioso periférico (SNP) está formado por las raíces nerviosas, los nervios, la unión neuromuscular y los músculos. Los nervios son las estructuras nerviosas encargadas de recoger o transmitir el impulso nervioso a los miembros u órganos periféricos. Las estructuras que lo forman son los pares craneales, las raíces nerviosas, los ganglios raquídeos dorsales, los ganglios vegetativos y los nervios periféricos. Los nervios periféricos son estructuras cordonales que contienen fibras nerviosas formadas por los axones de neuronas motoras somáticas, motoras vegetativas o sensitivas y células de Schwann. Por esta razón los nervios pueden clasificarse como motores (eferentes), sensitivos (aférentes) o mixtos. La mayoría de los troncos nerviosos principales son mixtos y contienen fibras motoras, sensitivas y vegetativas.

2.1.1. Estructura

Las fibras nerviosas que conforman los nervios periféricos están constituidas por grupos de axones de grosor variable en función del tipo de fibra, recubiertas de células de Schwann y protegidas por tejido conectivo circundante, que separa las distintas fibras nerviosas (endoneuro), las agrupa en fascículos (perineuro) y las aísla de los tejidos circundantes (epineuro; Figura 1).

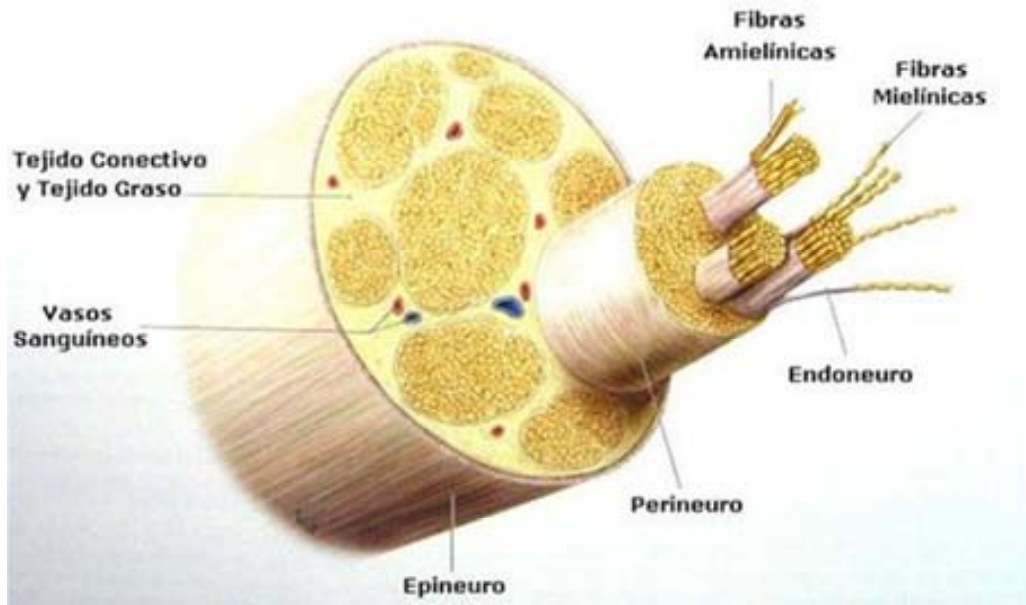


Figura 1. Estructura macroscópica del nervio periférico. Imagen adaptada de Texto y Atlas de Anatomía Prometheus, volumen 3. Versión: <http://www.med.ufro.cl/>

Las características funcionales del axón de una fibra nerviosa determinan su morfología y la de la célula de Schwann que le da soporte. Las fibras nerviosas pueden estar mielinizadas (fibras mielinizadas) o no (fibras amielinizadas) y se clasifican, dependiendo de sus características funcionales, en varios subgrupos (Figura 2). Las fibras de mayor grosor (A y B) están recubiertas de una cubierta de mielina compacta cuyo grosor depende del diámetro del axón que recubren.

TIPO FIBRAS		Función	DIAMETRO (μM)	VELOCIDAD CONDUCCIÓN (m/s)	
Erlanger y Gasser	Numérica				
A	α	Ia	Motor somático Propriocepción (husos musculares)	12-20	70-120
		Ib	Propriocepción (Órganos de Golgi)		
	β	Tacto, presión	5-12	30-70	
	γ	Motor (husos musculares)	3-6	15-30	
	δ	Dolor (rápido), frío, tacto	2-5	12-30	
B		Preganglionaries autonómicas	<3	3-15	
C	Raíz dorsal	IV	Dolor (lento), mecanoreceptores, temperatura	0.4-1.2	0.5-2
	Vegetativas		Postganglionares autonómicas	0.3-1.3	0.7-2.3

Figura 2. Clasificación de los tipos de fibras nerviosas y descripción de sus características fisiológicas

Entre las fibras mielinizadas de mayor grosor se encuentran las motoras voluntarias y propioceptivas musculares. Los axones de las fibras amielínicas, que son los de menor diámetro, se encargan de la transmisión de dolor y temperatura y de funciones vegetativas. En las fibras nerviosas amielínicas una célula de Schwann engloba en su citoplasma varios axones de pequeño calibre, dándoles soporte. En las fibras mielinizadas, cada célula de Schwann se encarga de envolver un segmento de aproximadamente 100μm de longitud de un axón. Entre dos células de Schwann mielinizantes contiguas persiste un pequeño segmento de axón expuesto de 1-2μm llamado nodo de Ranvier (NdR). El espacio entre dos nodos de Ranvier, ocupado por una célula de Schwann recibe el nombre de espacio internodal (Figura 3).

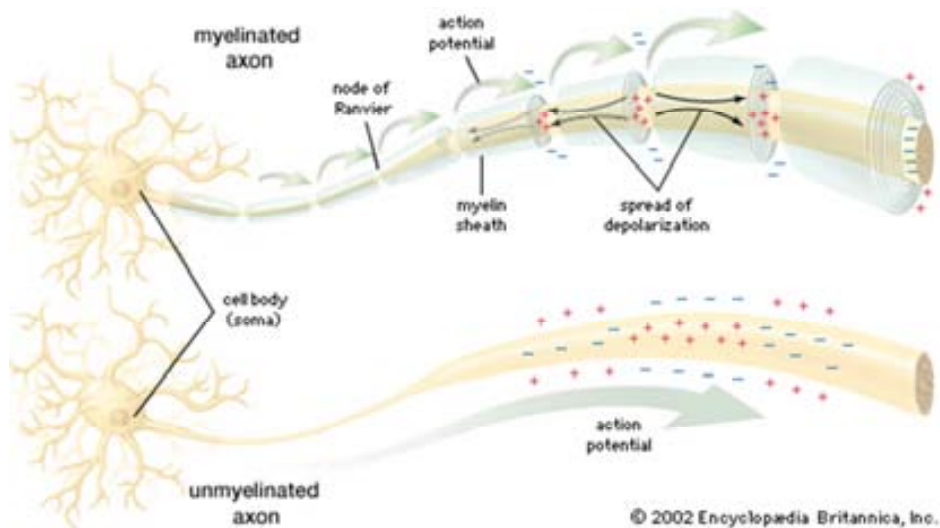


Figura 3. Estructura de la fibra mielinizada y esquema de la conducción saltatoria a través de los nodos de Ranvier. Cortesía de Encyclopædia Britannica, Inc

2.1.2. El nodo de Ranvier: Estructura, dominios funcionales e importancia en la conducción nerviosa

El proceso de mielinización se produce de forma similar en el sistema nervioso central y periférico, aunque cada uno cuenta con particularidades específicas(1). Mientras en el sistema nervioso central la célula encargada de la formación de la vaina de mielina es el oligodendrocito, en el SNP esta función la lleva a cabo la célula de Schwann(2). El oligodendrocito es capaz de mielinizar varios axones simultáneamente, mientras la célula de Schwann mieliniza un único axón. La mielinización en el SNP es el proceso por el cual dobles capas de membrana plasmática se enrollan en torno al axón para crear una vaina aislante cuyo cometido principal es hacer más eficiente la conducción nerviosa. Sin embargo, la vaina de mielina no sólo aísla a los axones de los axones contiguos y del espacio extracelular, sino que también proporciona soporte trófico al axón y es clave en el proceso de regeneración del axón tras una lesión nerviosa(2).

En el proceso de mielinización la unión axo-glial determina la aparición de dominios de membrana específicos con características funcionales diferenciadas. Aparecen así dominios contiguos pero con estructura molecular y funciones específicas como son la zona internodal, el yuxtaparano, el paranodo y el Ndr(Figura 4) (3). La aparición de estos dominios específicos, separados mediante uniones estrechas entre la membrana de la célula de Schwann y el axón, restringe la difusión de moléculas de membrana del axón a otros dominios funcionales. La integridad de dicha separación en dominios funcionales y moleculares es fundamental para el correcto desarrollo del nervio periférico y para la propagación saltatoria del impulso nervioso(1, 4).

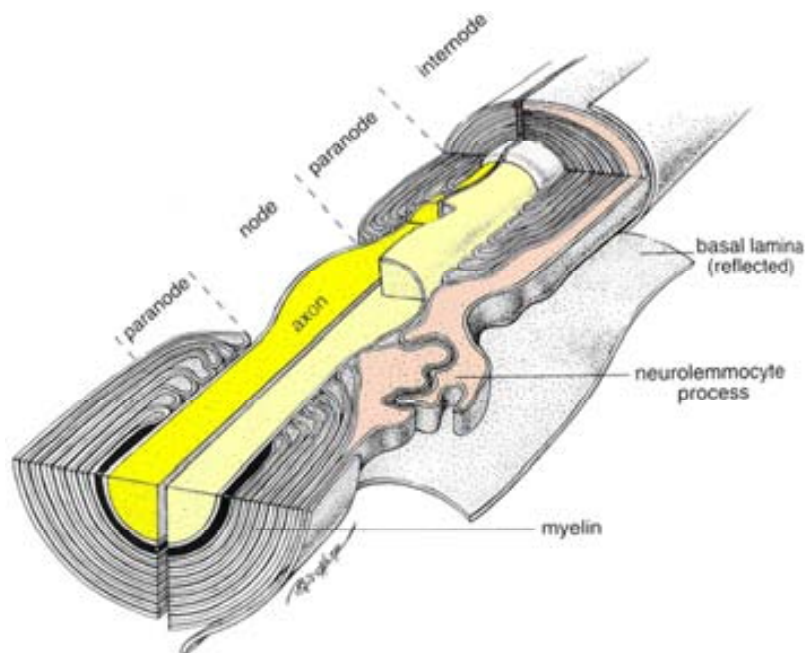


Figura 4. Estructura del nodo de Ranvier en el SNC (izquierda de la imagen) y en el SNP (derecha de la imagen), en la que se ve la presencia de vellosidades de las células de Schwann el nodo periférico de las que carece la fibra miélica en el SNC. Obtained from Veterinary NeuroHistology Atlas, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota. <http://vanat.cvm.umn.edu/neurHistAtls/pages/glia15.html>

Los mecanismos detallados por los cuales se produce la mielinización periférica y la organización en diferentes dominios regionales son desconocidos, pero algunas de las moléculas implicadas en las uniones entre axón y célula de

Schwann, de éstas a la matriz extracelular y al citoesqueleto y los canales responsables de la conducción saltatoria han sido descritas parcialmente(4). En el proceso de mielinización la célula de Schwann inmadura extiende dos procesos siguiendo el trayecto del axón. Los extremos de dichos procesos definirán la presencia de un NdR. La célula de Schwann extiende su membrana lateralmente y se enrolla de forma espiral alrededor del axón. En este proceso tiene un papel clave la matriz extracelular que, en el caso del nervio periférico, recibe el nombre de membrana basal(1).

Los NdR son los espacios comprendidos entre dos células de Schwann que se encuentren formando la vaina de mielina a lo largo de un mismo axón y en los que se encuentra un segmento de axón desprovisto de recubrimiento mielínico. Los NdR se distribuyen de forma regular a lo largo de una fibra nerviosa y son los responsables de la conducción saltatoria del impulso nervioso. Los NdR son ricos en canales de sodio dependientes de voltaje (principalmente Nav1.6). Los canales de sodio son fundamentales para la propagación del impulso nervioso y su ausencia determina una reducción dramática de la velocidad de conducción en el nervio(5).

La localización específica de los canales de sodio depende de diversas moléculas de adhesión celular (CAMs) y de citoesqueleto que ayudan a mantener la conformación del NdR (Figura 5).

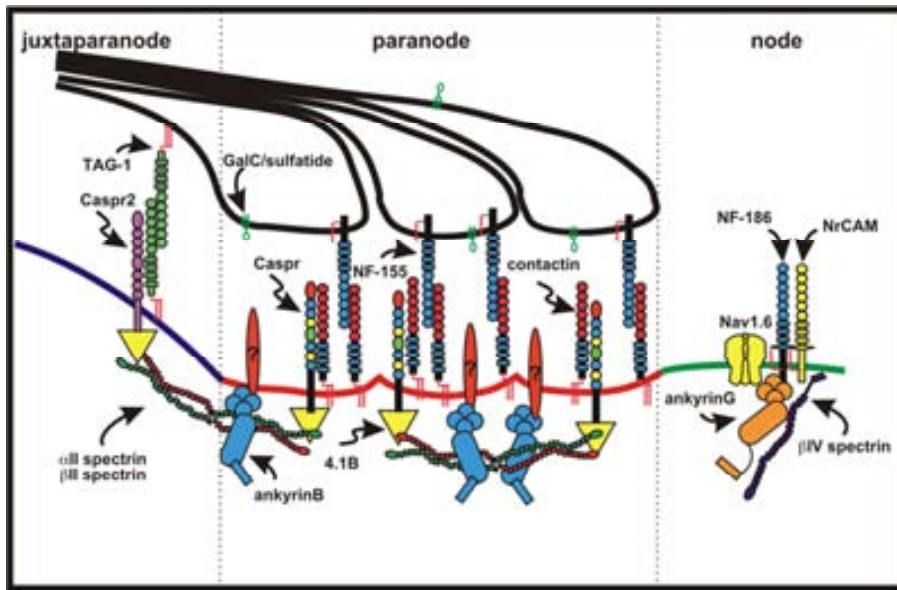


Figura 5. Estructura del nodo de Ranvier y regiones adyacentes en el que se muestra la presencia de 3 dominios funcionales diferenciados: nodo, paranodo y yuxtapanodo, con una composición molecular específica que determina su función. Imagen extraída de Ogawa y cols(6)

Entre ellas se encuentran la neurofascin-186 (NF186), la NrCAM, la β IV-spectrin y la ankyrin-G(7-9). Los canales de sodio se agrupan gracias a la ankyrin-G y la β IV-spectrin(10). A su vez, la ankyrin-G se une a la NF186 que se encarga de coordinar el agrupamiento de los canales de sodio y su localización en el NdR(11, 12). Otras CAMs como la gliomedina (GMD se expresan en prolongaciones de membrana de las células de Schwann proyectadas hacia la zona nodal llamadas microvellosidades(13). La GMD se une a NrCAM y NF186, de tal forma que el complejo ankyrin-G- β IV-spectrin-canales de sodio-NF186 queda agrupado y anclado, por un lado al citoesqueleto del axón y por el otro a la célula de Schwann, asegurando su estructura(14). Esto sugiere que, probablemente, la célula de Schwann es la responsable del agrupamiento de los canales de sodio y del mantenimiento de la estructura del NdR.

El paranodo es la zona contigua al NdR en la que la célula de Schwann forma bucles de membrana que se anclan al axón formando septos. Estas uniones axo-gliales impiden la difusión de las moléculas del NdR al yuxtapanodo, anclan la

célula de Schwann al axón y son fundamentales en el proceso de mielinización(15). En el establecimiento de las uniones axo-gliales en el paranodo juega un papel fundamental el complejo formado por contactin-1 (CNTN1) y contactin-associated protein-1 (CASPR1). Ambas son proteínas de membrana que forman dímeros y cuya expresión requiere de la presencia de ambas en la membrana(16, 17). El complejo CNTN1/CASPR1 presente en el axolema se une a la isoforma 155 de la neurofascina (NF155), expresada en los bucles paranodales de la célula de Schwann(18). NF155 surge mediante un proceso de splicing alternativo del mRNA del gen NFASC, que codifica también para la proteína NF186 del NdR. La unión entre NF155 y el complejo CNTN1/CASPR1 asegura la separación entre los canales de potasio del yuxtaparanodo y los de sodio del NdR(19). A su vez, el complejo NF155/CNTN1/CASPR1 está anclado al citoesqueleto gracias a la proteína 4.1B y a diversas isoformas de spectrin que garantizan la estabilidad de las uniones axo-gliales y la separación de los diversos dominios funcionales de la membrana axonal(20). Los ratones mutantes para NF155, CNTN1 y CASPR1 comparten un fenotipo en el que, además de afectación central (predominantemente cerebelosa), presentan una afectación nerviosa periférica caracterizada electrofisiológicamente por amplitudes y velocidades reducidas de los potenciales motores, características que pueden encontrarse en algunas neuropatías hereditarias y adquiridas(16-18, 21-23). A excepción de pequeñas variaciones patológicas los 3 mutantes muestran una separación de la membrana de la célula de Schwann y el axolema visible por microscopía electrónica así como la localización aberrante de los canales de potasio del yuxtaparanodo en el paranodo.

La región yuxtaparanodal es la región contigua al paranodo. Constituye un dominio axonal diferente caracterizado por la alta densidad de canales de potasio dependientes de voltaje (especialmente los subtipos Kv1.1 y Kv1.2) y cuya función más evidente es la repolarización del axón(24). Las CAMs también tienen un papel clave en el mantenimiento de la estructura del yuxtaparanodo (Figura 5). En este caso las proteínas fundamentales son contactin-2 (TAG-1) y contactin-associated protein 2 (CASPR2) que, de la misma manera que en el paranodo, forman un complejo dimérico estable(25, 26). La ausencia de CASPR2 conlleva la distribución de los canales de potasio a lo largo de toda la región internodal

El internodo o región internodal es la zona comprendida entre dos yuxtaparanodos y abarca el 99% de un segmento mielinizado de nervio. El grosor de la capa de mielina en la región internodal está determinado por el diámetro del axón que envuelve, aunque los mecanismos moleculares que determinan el grosor de la envuelta miélica permanecen desconocidos(27). Diversas proteínas de esta región son también fundamentales en el mantenimiento de la vaina de mielina, como la myelin associated glycoprotein (MAG), Par-3 o las proteínas nectin-like (Necl)(28, 29).

La organización de la fibra mielinizada en dominios funcionales tiene como cometido fundamental aumentar la eficiencia de la conducción nerviosa. El impulso nervioso en una fibra mielinizada se inicia en el soma de la neurona o en los terminales periféricos (en el caso de las neuronas sensitivas) y el potencial de acción se transmite de forma saltatoria a través de los NdR gracias a corrientes de sodio hacia el interior del axón generadas por los canales de sodio situados en el NdR. Los canales de potasio Kv1 localizados en el yuxtaparanodo son los responsables de la hiperpolarización del axón tras un potencial de acción

que impide la propagación del potencial hacia atrás y de la vuelta de la membrana axonal al potencial de reposo. La estrecha unión axo-glial tiene como función fundamental separar físicamente los canales de sodio Nav1 de los Kv1 y preservar así la especialización funcional(27). La ausencia de alguna de las proteínas encargadas de la unión axo-glial o de agrupar los Nav1 en el nodo de Ranvier o los Kv1 en el yuxtaparanodo, provoca la incorrecta localización de dichos canales. La difusión de los canales de K⁺ hacia el internodo debida a la ausencia de CASPR2 o TAG-1 determina hiperexcitabilidad en la fibra nerviosa(30). Sin embargo, la difusión de los canales de Na⁺ hacia el paranodo secundaria a la ausencia de las proteínas paranodales conlleva una profunda alteración de la conducción saltatoria evidente en los modelos animales(31). En resumen, la especialización de los dominios de membrana axonales del NdR y estructuras relacionadas, tiene implicaciones funcionales críticas para la correcta propagación del impulso nervioso y, por tanto, su alteración puede conllevar la aparición de enfermedades neurológicas.

2.1.3. Inmunología en el sistema nervioso periférico

El SNP está aislado del sistema inmune sistémico por la barrera hemato-nerviosa (BHN), que impide la difusión directa de células y moléculas solubles del sistema inmune hacia las fibras nerviosas. La integridad de la BHN es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis inmune en el SNP y su ruptura es clave en el desarrollo de diversas neuropatías inmunomediadas(32). La presencia de la BHN implica que el SNP sea considerado un sistema inmuno-privilegiado, aunque el aislamiento que determina es menor que el de su homóloga en el sistema nervioso central, la barrera hematoencefálica. Las raíces nerviosas, el ganglio raquídeo dorsal

(GRD) y la unión neuromuscular son las únicas regiones en las que la BHN no está presente y, a priori, las áreas más expuestas a moléculas y células circundantes. A pesar de que el SNP sea inmuno-privilegiado, tiene un complejo sistema de vigilancia inmune, que incluye células T, B y, especialmente, células presentadoras de antígenos (CPAs) como los macrófagos(33). Además, las propias células de Schwann tienen la capacidad de activarse ante la presencia de daño en la fibra nerviosa y son capaces de presentar antígenos(34). El conocimiento de la acción del sistema inmune en el SNP está fundamentalmente basado en el estudio de modelos animales mientras que el conocimiento de los mecanismos específicos en humanos, tanto en salud como en enfermedad, es muy limitado. El modelo animal más utilizado es la neuritis alérgica experimental (EAN), en la que se consigue la aparición de una neuropatía inflamatoria monofásica tras la inoculación de mielina completa, proteínas de la mielina (P2, P0, PMP22) o péptidos derivados de éstas proteínas(35). Las enfermedades inflamatorias o autoinmunes del nervio periférico se caracterizan por la presencia de infiltrados inflamatorios, depósito de inmunoglobulinas y complemento en la superficie de las fibras nerviosas, desmielinización y daño axonal en grado variable dependiendo de la enfermedad. La mayor parte de estos cambios se asemejan a los encontrados en la EAN, aunque no pueden considerarse estrictamente homólogos(33).

2.1.3.1. Inmunidad celular en el nervio periférico

La característica inmunopatológica fundamental en la EAN y en varias neuropatías autoinmunes como el Síndrome de Guillain-Barre (SGB) o la poliradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante crónica (CIDP) es la presencia de infiltrados inflamatorios perivenulares en el nervio periférico(36). La ruptura de la barrera hemato-nerviosa y entrada de las células inflamatorias en el nervio periférico ha sido estudiada en la EAN. Algunas de las citocinas,

moléculas de adhesión y metaloproteasas necesarias para que este proceso se lleve a cabo están aumentadas en el suero o LCR de pacientes con neuropatías inflamatorias y el papel de las células T activadas como iniciadoras de la respuesta inmune en el nervio está bien documentada en modelos animales(37). Tras el encuentro de las células T con el antígeno presentado por las CPAs las células T comienzan su expansión clonal. En la CIDP, por ejemplo, se ha demostrado la expansión de poblaciones mono u oligoclonales de linfocitos T CD8+ mediante la secuenciación de sus receptores de célula T (TCR)(38). Estos hallazgos sugieren que las células CD8+ con reactividades antigénicas restringidas proliferan activamente en la CIDP en respuesta a un antígeno cuya naturaleza es desconocida.

El antígeno es presentado a las células T gracias al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (reconocido por las CD8+) y de clase II (reconocido por las CD4+). La expresión del MHC-II está restringida a las CPAs (linfocitos B, monocitos y macrófagos, células dendríticas), mientras el MHC-I se expresa en todas las células del organismo salvo escasas excepciones. Algunos haplotipos de MHC-II se han asociado al desarrollo de SGB(39, 40). Una vez activadas las células T secretan citocinas proinflamatorias (IL2, IFN- γ , TNF- α) que contribuyen a propagar la respuesta inmune. En varias neuropatías autoinmunes la activación de células T circulantes está incrementada(41). Aunque el antígeno responsable de esta activación, en general, se desconoce, algunos estudios han demostrado que la adición a cultivos de células T de pacientes con SGB del gangliósido GM1 (antígeno bien caracterizado en el SGB) determina un aumento de la secreción de IFN- γ (42). Además, los niveles de células productoras de IFN- γ es superior que en controles, sugiriendo un papel fundamental de linfocitos T CD4+ en estas neuropatías.

Las células T no sólo tienen un papel en la generación de una respuesta inflamatoria en el nervio periférico, sino también en su terminación. Las células T reguladoras (Tregs) se caracterizan por los marcadores de superficie CD4+CD25+ y la presencia del factor de transcripción FoxP3 y por la secreción, entre otras, de interleucina-10 (IL10)(43). La ausencia de Tregs determina un aumento de fenómenos autoinmunes(44) y su déficit o función defectuosa se ha descrito en varias enfermedades autoinmunes(45). Tanto los niveles de Tregs como su función están alteradas en la CIDP y el GBS, lo que podría contribuir al desarrollo de ambas enfermedades(41, 46-50).

2.1.3.2. Inmunidad humoral en el nervio periférico

2.1.3.2.1. *Anticuerpos*

En las neuropatías autoinmunes, especialmente en el SGB, se acepta con carácter general como factor inicial en su patogenia la presencia de una respuesta humoral específica dirigida contra glucolípidos de membrana. La presencia de anticuerpos contra diversos gangliósidos o contra glucolípidos relacionados se ha reportado tanto en el SGB como en la CIDP, la neuropatía motora multifocal (NMM) y las neuropatías atáxicas crónicas(51). A su vez se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra epítomos glicosilados de la proteína MAG de la mielina en pacientes con neuropatía asociada a gammapatía monoclonal(52). El ejemplo paradigmático del papel de la inmunidad humoral en el nervio periférico es el SGB, enfermedad postinfecciosa en la que se ha demostrado que existe una reactividad cruzada de anticuerpos dirigidos contra antígenos de microorganismos patógenos (como *Campilobacter*, *Haemophilus* o citomegalovirus) y gangliósidos presentes en las fibras nerviosas

como GM1(53). En el caso del Campilobacter, la generación de una respuesta humoral contra el lipooligosacárido de la membrana del Campilobacter, por un mecanismo de mímica molecular, deriva hacia una respuesta contra el gangliósido GM1, presente en los axones de fibras mielinizadas. El proceso por el cual se generan dichos autoanticuerpos o las reactividades antigénicas específicas no están tan claras en otros subtipos de SGB o en la CIDP. Independientemente del mecanismo que lleve a la generación de autoanticuerpos contra el nervio periférico, su presencia puede determinar daño en las células diana gracias a mecanismos diversos: internalización del antígeno diana, fijación de complemento y lisis celular o unión a receptores de inmunoglobulinas (FcR) de los monocitos que determine la activación de éstos y la fagocitosis de la célula diana.

La patogenicidad de los anticuerpos detectados en neuropatías inmunomediadas es controvertida. En el caso de algunos anticuerpos antigangliósido (GQ1b o GD1b) se ha demostrado que son capaces de alterar la transmisión neuromuscular o dañar las neuronas del ganglio raquídeo dorsal(54, 55). Sin embargo, la patogenicidad de muchos de los antígenos descritos tanto para el SGB como para otras neuropatías (proteínas de la mielina, otros gangliósidos, complejos de gangliósidos) es controvertida. En cualquier caso, independientemente de su potencial patogénico, la descripción de distintas reactividades antigénicas en las neuropatías inmunomediadas ha contribuido a la descripción de fenotipos específicos asociados a cada reactividad y, por tanto, ha ayudado en

el proceso diagnóstico o en el establecimiento del pronóstico de cada fenotipo específico(51).

2.1.3.2.2. El papel de los anticuerpos como biomarcadores

El estudio del papel de los anticuerpos en las enfermedades autoinmunes y, particularmente, el descubrimiento de su antígeno diana, tiene implicaciones fundamentales en el conocimiento de la patogenia de la enfermedad pero, además, tiene utilidad directa en la práctica clínica diaria. Los autoanticuerpos reactivos contra antígenos específicos de enfermedad tienen una utilidad en la práctica clínica triple. Por un lado facilitan el diagnóstico de la enfermedad, distinguiéndola de otras enfermedades similares o de patogenia diferente, lo cual puede tener, a su vez, implicaciones directas en el tratamiento o en el pronóstico para el paciente. Por otro lado, en algunos casos, los títulos de autoanticuerpo correlacionan con la gravedad de la enfermedad, de tal forma que las variaciones de los títulos pueden ser monitorizadas y ajustar los tratamientos en función no sólo de parámetros clínicos o de síntomas subjetivos sino también de los títulos de anticuerpo. Finalmente, las características del autoanticuerpo detectado o de su antígeno diana pueden proporcionar pistas sobre su patogenia e, incluso, guiar las estrategias terapéuticas. Por ejemplo, el mecanismo que conduce a la producción de un autoanticuerpo IgM, IgE, IgA o IgG está marcado por la naturaleza inicial de la respuesta inmune, por las características del tejido en el que se produce la sensibilización, por la localización y naturaleza química del antígeno, etc. De la misma forma el ataque

contra antígenos nucleicos, proteínas, lípidos o glúcidos, depende de mecanismos inmunes diferentes, por lo que del análisis de las características del antígeno también pueden obtenerse conclusiones útiles al respecto de la patogenia de la enfermedad y, por tanto, pueden guiar la selección de terapias inmunosupresoras o de desensibilización.

Los autoanticuerpos altamente específicos de una enfermedad suelen ser, en la mayor parte de los casos, patogénicos a su vez. El bloqueo del antígeno diana o la destrucción de la célula en la que reside determinan el fenotipo de la enfermedad en estos casos. Sin embargo, en multitud de enfermedades se han descrito autoanticuerpos sin potencial patogénico que, sin embargo, se asocian de manera relativamente específica a una enfermedad y, por tanto, pueden ser utilizados para su diagnóstico. Por esta razón, aunque la descripción de asociaciones clínico-inmunológicas no tenga implicaciones directas en el conocimiento último de la patogenia de la enfermedad, su descubrimiento puede tener implicaciones directas en el manejo de los pacientes con enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades neuromusculares han sido pioneras en la descripción de autoanticuerpos específicos que han cambiado drásticamente la forma en que se diagnostican o tratan. El hallazgo en los años 70 de la presencia de anticuerpos contra el receptor de acetilcolina (AChR) en más del 80% de los pacientes con miastenia gravis (MG) fue crucial para avanzar en el conocimiento de la enfermedad, pero además ayudó a distinguir aquellas miastenias de origen autoinmune de las de origen congénito, así como a guiar la

selección de tratamientos (recambio plasmático, inmunoglobulinas, esteroides)(56). Estudios posteriores determinaron los epítomos, contra los que iba dirigido el anticuerpo, sus isotipos (IgG1 e IgG3), el papel del timo y, por tanto, de las células T CD4+ en su patogenia, etc. Aun así, el 15% de los pacientes en los que se sospechaba una MG autoinmune no tenían autoanticuerpo conocido hasta que fue descubierto un subgrupo de pacientes que reaccionaban contra la proteína Muscle specific-kinase (Musk)(57). El descubrimiento de dicho autoanticuerpo hizo evidente algo que hasta entonces había pasado desapercibido: que existía un subgrupo de pacientes dentro de la MG autoinmune, con peor pronóstico, peor respuesta a tratamiento esteroideo y una distribución de los síntomas diferente. Además los anticuerpos patogénicos eran del isotipo IgG4 lo que presume un origen patogénico diferente(58). Finalmente, de forma paradigmática, la descripción de estos subgrupos ha llevado a descubrir que el tratamiento con terapias anti-CD20 (contra células B) puede cambiar dramáticamente el pronóstico de estas enfermedades dependiendo de cuál es su autoanticuerpo(59).

Las neuropatías inmunomediadas, que serán descritas más adelante, también son ejemplo paradigmático de cómo la descripción de reactividades antigénicas puede ayudar definitivamente en la práctica clínica diaria.

2.1.3.3. Funciones inmunes de las células de Schwann

Como ha sido mencionado previamente, el papel fundamental de las células de Schwann es proteger y dar soporte trófico al axón y formar la capa aislante de mielina para mejorar la eficiencia de la transmisión del

impulso nervioso. Sin embargo las células de Schwann, además, tienen un papel clave en los mecanismos inmunes encargados de proteger al nervio periférico. Las células de Schwann son capaces de reconocer y presentar antígenos y de modular la respuesta inmune que está teniendo lugar en el nervio periférico(60).

Durante el curso de una respuesta inmune contra un microorganismo o de un autoantígeno dos sistemas juegan papeles sucesivos. El reconocimiento inicial del antígeno y el desencadenamiento de una respuesta inmune comienza con la inmunidad innata, cuya respuesta es esencialmente idéntica cada vez que el mismo antígeno es reconocido y cuya misión principal es detectar patrones moleculares asociados a patógenos. Las células principales (aunque no exclusivas) de esta respuesta inicial son los granulocitos, los monocitos y células dendríticas y los linfocitos natural killer. Tras la respuesta innata, tiene lugar una respuesta inmune adaptativa. Esta segunda respuesta es altamente específica para cada antígeno y viene determinada fundamentalmente por el procesamiento del antígeno por algunas de las células de la inmunidad innata (monocitos y células dendríticas mayoritariamente) y su presentación a las células de la inmunidad adquirida (particularmente las células T). Existen múltiples receptores y moléculas encargadas de detectar patrones moleculares asociados a patógenos, aunque los más conocidos son los “toll-like receptors” (TLRs)(61). Los TLRs reconocen patrones moleculares que se asocian a organismos patógenos y son los encargados de iniciar la respuesta inmune (Figura 6).

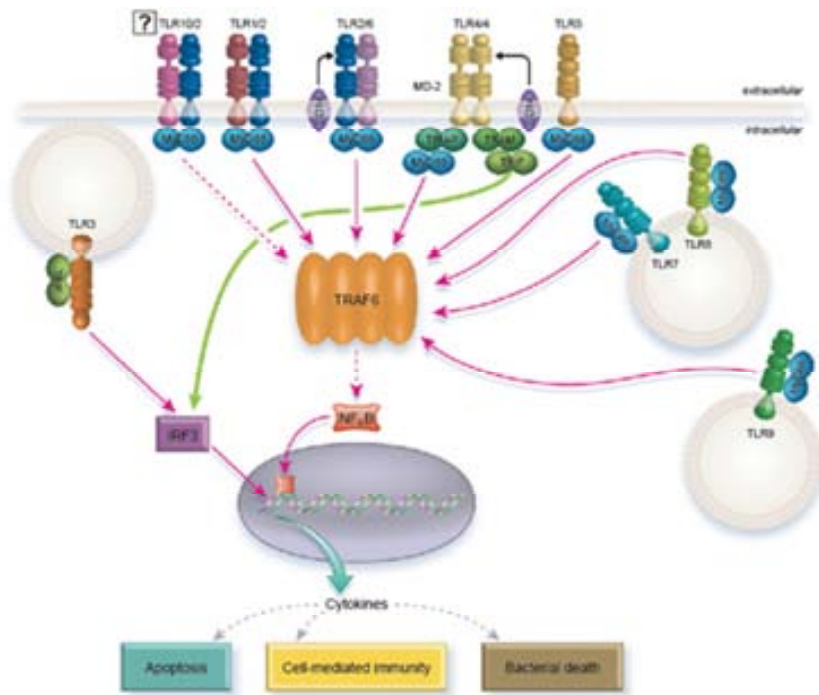


Figura 6. Vías de señalización de los Toll-like receptors. Obtained from Adserotec <http://www.abdserotec.com/toll-like-receptor-minireview-trlr.html>

También son capaces de detectar algunas moléculas endógenas, lo cual hace que también hayan sido descritos como claves en las respuestas contra antígenos endógenos y, por tanto, en la aparición de autoinmunidad(62). Existen hasta 11 TLRs diferentes, situados en la superficie de la membrana o en vesículas del citoplasma, cada uno de los cuales reconoce patrones moleculares diferentes. Por ejemplo, el TLR4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) de la pared de las bacterias gram negativas, el TLR3 reconoce RNA de doble cadena o el TLR9 reconoce DNA no metilado, etc.

Los TLRs los expresan habitualmente las células presentadoras de antígenos. Sin embargo, ante condiciones inflamatorias, las células de Schwann son capaces de expresar algunos TLRs en su superficie, especialmente TLR3, TLR4 y TLR7 y, por tanto, de reconocer antígenos(63).

De hecho, las células de Schwann secretan factores de crecimiento, quimiocinas e inhibidores de proteasas tras la estimulación de TLR4 mediante LPS o de TR2 y TLR3(60). Asimismo se ha demostrado la presencia en las células de Schwann de grandes cantidades del factor de transcripción Nf- κ B, que es crucial en las cascadas pro-inflamatorias tras la estimulación de los TLRs(64, 65).

Además de responder activamente ante la estimulación de TLRs, las células de Schwann son capaces de sobreexpresar moléculas de MHC-I y II en ambientes pro-inflamatorios y, por tanto, de presentar antígenos(34).

Además la expresión de moléculas de MHC-II por parte de las células de Schwann también ha sido demostrada en las biopsias de pacientes con SGB. La presencia de moléculas co-estimuladoras en la superficie de la célula de Schwann refuerza su probable papel como CPA en el nervio inflamado(66).

Por otro lado las células de Schwann son capaces de secretar varias citocinas ante determinadas condiciones. Entre ellas están las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α (67, 68) y la citocina reguladora TGF- β (69). Además las células de Schwann expresan constitutivamente receptores de TNF- α . Otros moduladores de la respuesta inmune como el óxido nítrico, los leucotrienos, las prostaglandinas y los tromboxanos también pueden ser secretados por las células de Schwann(70, 71).

Finalmente, las células de Schwann también parecen jugar un papel en la finalización de la respuesta inmune localmente. En ambiente pro-inflamatorio las células de Schwann expresan en su superficie el ligando de Fas (FasL), cuya interacción con el receptor Fas en la superficie de las

células T determina la apoptosis de éstas, contribuyendo así a la terminación de la respuesta inmune(72, 73).

En resumen, las células de Schwann no sólo son imprescindibles para dar soporte trófico al axón y mejorar la transmisión del impulso nervioso, sino que son claves tanto en la generación como en la terminación de respuesta inmunes en el nervio periférico.

2.2. Neuropatías autoinmunes

2.2.1. Introducción

Las neuropatías inflamatorias o autoinmunes son un grupo heterogéneo de neuropatías adquiridas, agudas o crónicas, cuya característica en común es la respuesta a terapias inmunomoduladoras o inmunosupresoras. Generalmente se clasifican como neuropatías autoinmunes el SGB y sus variantes, la CIDP, la MMN y la neuropatía asociada a paraproteinemia(74). Dentro de ellas diversas se han descrito variantes y subgrupos específicos que se detallarán más adelante. Ocasionalmente se incluyen en este grupo las neuropatías vasculíticas y las paraneoplásicas que, dada su frecuente asociación con enfermedades sistémicas y sus particularidades patogénicas, no suelen considerarse dentro del mismo grupo que las neuropatías autoinmunes primarias. En definitiva, las neuropatías autoinmunes constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades con particularidades clínicas y patológicas (Tabla 1).

2.2.2. Características clínicas de las neuropatías autoinmunes

2.2.2.1. Síndrome de Guillain-Barré y variantes

El SGB ha sido clásicamente definido por la presencia de una debilidad ascendente, simétrica, de curso subagudo (alcanza el nadir dentro del primer mes de inicio) y con arreflexia que acontece tras una infección en el mes precedente (generalmente de vías respiratorias altas o

gastroenteritis), aunque también puede suceder en el contexto de vacunación reciente o de neoplasias(75). Los criterios diagnósticos clásicos recogen este cuadro clínico que correspondería con el SGB típico(76). Aunque característicamente se define al SGB como un cuadro motor, la presencia de hipoestesia con patrón polineuropático en guante y calcetín es una característica casi constante en el SGB típico.

Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE LAS NEUROPATÍAS INFLAMATORIAS (modificado de Meyer zu Horste)(35)

	Antígenos descritos
Síndrome de Guillain-Barré y variantes	
Polineuropatía aguda inflamatoria desmielinizante (AIDP)	
Neuropatía aguda axonal motora (AMAN)	GM1, GD1a
Neuropatía aguda axonal sensitivo-motora (AMSAN)	GM1, GD1a
SGB sensitivo	GD1b
Neuropatía sensitivo-atáxica aguda (ASAN)	Disialosil
Síndrome de Miller-Fisher	NeuNAcNeuNAcGal
SGB atáxico	GQ1b
Variantes locoregionales	
Parálisis faringo-cérvico-braquial	GT1a
Pandisautonomía aguda	
Poliradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP)	
CIDP típica	P0, PMP22, P2,
CIDP atípica	LM1
CIDP sensitiva pura	CAMs (Contactin-1,
CIDP motora pura	Neurofascin 155,
CIDP atáxica pura	NrCAM, gliomedin,
Variante distal (DADS)	neurofascin 186)
Asimétrica (variante Lewis Sumner)	
Neuropatía Motora Multifocal (NMM)	
NMM con bloqueos de la conducción	
NMM sin bloqueos de la conducción	GM1 IgM
Polineuropatía asociada a gammapatía monoclonal de significado incierto IgM (MGUSP)	
MGUSP asociada a anticuerpos anti-MAG	MAG
MGUSP con gammapatía monoclonal IgM sin anti-MAG	

Sin embargo el espectro clínico actual de neuropatías inflamatorias agudas o subagudas postinfecciosas abarca fenotipos clínicos diversos que incluyen variantes motoras o sensitivas puras, variantes con afectación de pares craneales añadida o exclusiva, variantes locales como la parálisis faringo-cérvico-braquial y variantes atáxicas con o sin oftalmoparesia como el síndrome de Miller-Fisher o la neuropatía atáxica aguda(77). La clasificación de las variantes del SGB atendiendo a criterios electrofisiológicos es la más utilizada, aunque también se han propuesto clasificaciones atendiendo a criterios patológicos. Independientemente de la clasificación que se tenga en cuenta la forma típica de SGB presenta características electroneurográficas que sugieren una patología desmielinizante de nervio periférico o raíz nerviosa. Sin embargo, un porcentaje significativo de pacientes presenta patología predominante o exclusiva axonal e, incluso las formas clásicas, pueden presentar degeneración axonal secundaria a la desmielinización con el tiempo. En cualquier caso, en el momento actual, se asume que el SGB es un conjunto de síndromes formando un espectro clínico continuo y con características clínicas y electrofisiológicas que pueden solaparse(78).

A pesar de ser relativamente infrecuente, con una incidencia de alrededor de 1/100.000 hab/año (entre 0.89 y 1.89 en países occidentales) el SGB es la neuropatía autoinmune más frecuente y una causa importante de parálisis aguda y, por tanto, de discapacidad en todos los grupos de edad(79-83). Su incidencia es estable con la excepción de pequeñas epidemias puntuales(84) y es discretamente más frecuente en hombres que en mujeres (Odds Ratio en torno a 1.5)(78, 81, 82, 85). Puede ocurrir

en cualquier grupo de edad, si bien la frecuencia aumenta un 20% por cada década de incremento de edad. En 2/3 de los pacientes la clínica está precedida por una infección respiratoria de vías altas o por diarrea(77).

Aunque se ha descrito la asociación del SGB con multitud de agentes patógenos y vacunas, los más frecuentemente detectados son el *Campylobacter jejuni* (en hasta el 30% de pacientes) y el citomegalovirus (que aparece en el 10% de SGB)(51). Aun así las probabilidades de desarrollar un SGB tras la infección por *Campylobacter* o citomegalovirus son relativamente bajas (alrededor de 1/1000 de pacientes infectados por dichos patógenos desarrollan posteriormente un SGB)(84, 86, 87). Además de los patógenos convencionales las vacunas son la segunda causa más frecuente de SGB y las responsables de que hayan sido reportadas pequeñas epidemias de SGB tras campañas masivas de vacunación. Se han descrito SGB tras la administración de vacunas diversas, aunque, debido a su uso masivo, las epidemias mejor caracterizadas de SGB fueron secundarias a vacunaciones contra el virus de la gripe(88).

En el SGB la localización o características de los síntomas pueden ser muy variables, aunque en la forma típica, predominan una debilidad subaguda de miembros relativamente simétrica que puede progresar rápidamente y afectar musculatura craneal, bulbar y respiratoria, parestesias e hipoestesia en guante y calcetín y arreflexia. Sin embargo existen diversas variantes con particularidades clínicas y electrofisiológicas que se detallan más adelante.

En el 70% de los casos de SGB existe afectación del facial y hasta el 25% de los pacientes requieren asistencia ventilatoria. El nadir se alcanza entre la primera y tercera semanas del comienzo y hasta 2/3 de los pacientes son incapaces de caminar sin ayuda en el momento más grave de la

enfermedad(78). Es relativamente frecuente la aparición de disautonomía durante el curso de la enfermedad que puede manifestarse como inestabilidad hemodinámica, alteraciones del ritmo cardiaco, alteraciones de la motilidad intestinal o síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética(89). El 5% de los pacientes con SGB fallecen por complicaciones derivadas de la enfermedad y, aunque el pronóstico se considera bueno en la mayor parte de los supervivientes, hasta un 20% de los pacientes requieren de asistencia a los 6 meses(80). El pronóstico del SGB puede ser predicho con relativa exactitud y de forma sencilla gracias a la escala EGOS, en la que la edad, presencia o no de diarrea y la puntuación en la escala de gravedad del SGB determinan con gran precisión las probabilidades de caminar de forma independiente a los 6 meses(90). El diagnóstico de la enfermedad se realiza en base a las características clínicas, la evolución y la ausencia de enfermedades concomitantes así como diversos factores que apoyan el diagnóstico y entre los que se encuentran los estudios neurofisiológicos(76). El estudio neurofisiológico es crucial, no sólo para ayudar al diagnóstico de la presencia de una polineuropatía, sino para ayudar a clasificar el SGB dentro de las variedades axonales o desmielinizantes. Los diferentes subtipos de patrón electrofisiológico se describen al describir las diferentes variantes clínicas(78). Aunque no es específico del SGB, la presencia de disociación albumino-citológica en el líquido cefalorraquídeo (LCR) también apoya el diagnóstico y forma parte de los criterios de diagnósticos de SGB. En el SGB se ha descrito la presencia de anticuerpos antigangliósido que, más allá del papel en su patogenia, pueden ayudar en el diagnóstico de la enfermedad(51). El patrón de reactividad, de nuevo, varía según el subtipo

de SGB del que se trate. Por otro lado, las pruebas complementarias rutinarias (bioquímica, hemograma, autoinmunidad, etc) han de estar encaminados a descartar la presencia de una polineuropatía aguda secundaria a otra patología. Algunas características clínicas o hallazgos en las pruebas complementarias atípicos deben levantar sospechas y hacer pensar en diagnósticos alternativos(77).

El tratamiento del SGB es exactamente el mismo para todas las variantes clínicas y, fundamentalmente, consiste en inmunoglobulinas endovenosas (IVIg) o recambio plasmático(91, 92). Ambos han demostrado una eficacia similar aunque las necesidades logísticas y las potenciales complicaciones que determina el recambio plasmático han hecho que predomine el uso de IVIg sobre la plasmaféresis. La respuesta a las inmunoglobulinas en pacientes con SGB parece estar determinada por los niveles conseguidos en plasma de ahí que se haya propuesto que, ante la ausencia de mejoría alguna al mes o ante la ausencia de niveles de IgG total en sangre inadecuados, pueda ser útil un curso de IVIg adicional(93). Los corticoides, tanto orales como endovenosos, no han demostrado efectividad en el SGB en ensayos clínicos aleatorizados, aunque existen series de casos, especialmente en pacientes con afectación radicular prominente (valorada por resonancia magnética con contraste) e inexcitabilidad precoz del nervio periférico en los que la adición de un curso de metilprednisolona en bolus podría ser efectiva(94, 95).

2.2.2.1.1. *Poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda (AIDP)*

La AIDP es la forma de SGB más frecuente en los países occidentales (Europa y América del Norte). Es la variante generalmente asimilada

con el SGB clásico a partir de la cual se elaboraron los criterios diagnósticos. Consiste, como ya ha sido mencionado, en una debilidad rápidamente progresiva, con alteraciones sensitivas distales con predominio de las modalidades sensoriales dependientes de fibra gruesa y arreflexia. La gravedad es variable pero en más de la mitad de los casos, compromete seriamente la autonomía del paciente en el momento álgido(77).

La variante AIDP se caracteriza electrofisiológicamente por la presencia de rasgos desmielinizantes en los estudios neurográficos. Entre ellos destacan la presencia de latencias distales alargadas, velocidades de conducción reducidas, bloqueos de la conducción o dispersión del potencial motor y aumento de latencia o desaparición de las respuestas F en ausencia de caídas de amplitud generalizadas y denervación (Tabla 1). Todas estas características (y esto sucede en cualquiera de las variantes del SGB) pueden no estar presentes al inicio de la enfermedad y, por tanto, ante un estudio electrofisiológico precoz normal es conveniente repetirlo más adelante(76).

La forma AIDP, a diferencia de las formas axonales no ha sido asociada a un patrón de anticuerpos antigangliósido concreto y, aunque se ha descrito la presencia de anticuerpos contra proteínas de la mielina, dichos anticuerpos son relativamente inespecíficos y no se utilizan en la práctica clínica diaria como biomarcadores(51).

Tabla 2. Criterios electrodiagnósticos de desmielinización en nervios periféricos en el síndrome de Guillain-Barré.

Asbury A.K. y Cornblath D.R., *Ann. Neurol* 1990;27(suppl.)S:21-24. Adaptada por cortesía de Ricardo Rojas

reducción de las velocidades de conducción en 2 ó más nervios motores

< del 80% del LIN si la amplitud es > del 80% del LIN
< del 70% del LIN si la amplitud es < del 80% del LIN

bloqueo de la conducción o dispersión temporal en 1 ó más nervios motores

criterios de bloqueo de la conducción:

aumento del 15% en la duración del pico negativo del potencial de acción entre estímulo proximal y distal,

disminución de más del 20% en el área de la amplitud entre el estímulo proximal y distal

criterios de dispersión temporal:

cambio mayor del 15% en la duración del potencial de acción entre el estímulo proximal y distal, disminución de más del 20% en el área de la amplitud entre el estímulo proximal y distal

latencias distales alargadas en 2 ó mas nervios

>125% del LSN si la amplitud es >80% del LIN
>150% del LSN si la amplitud es <80% del LIN

ausencia de ondas F o alargamiento de las latencias mínimas en 2 ó más nervios motores

>120% del LSN si la amplitud es >80% del LIN
>150% del LSN si la amplitud es <80% del LIN

La naturaleza desmielinizante de la variante AIDP determina una respuesta mejor a las terapias inmunomoduladoras que las variantes axonales y su pronóstico funcional a largo plazo, una vez superadas las fases iniciales en las que se presentan con mayor frecuencia las complicaciones, es mejor que el de las variantes axonales.

2.2.2.1.2. Formas axonales: Neuropatía axonal motora aguda (AMAN) y neuropatía axonal sensitivo-motora aguda (AMSAN)

La variante AMAN del SGB es la más frecuente en los países asiáticos y algunos latinoamericanos, aunque en nuestro medio supone aproximadamente un 10% del total de SGB. Se asocia de forma

característica a la diarrea como infección precedente y, específicamente, a infección por *Campylobacter jejuni*. Clínicamente se caracteriza por la presencia de síntomas muy predominantemente motores y por la presencia de hallazgos electrofisiológicos compatibles con daño axonal, manifiesto tanto por la caída de las amplitudes de los potenciales motores en las conducciones nerviosas como por la presencia de signos de denervación en el EMG de aguja en ausencia de hallazgos que sugieran desmielinización y, por tanto, que el daño axonal, pudiera ser secundario(78).

La presencia de anticuerpos antigangliósido GM1 se asocia fuertemente a este subtipo de SGB, aunque también es frecuente la presencia de anti-GD1a(96-98). A pesar de que algunos estudios proponen que en un seguimiento de 3 años el pronóstico tiende a equipararse al de las variantes AIDP, en general, el pronóstico funcional a largo plazo de las variantes motoras del SGB es claramente peor que las desmielinizantes(99).

La variante AMSAN del SGB presenta un patrón epidemiológico y clínico similar al de la variante motora pura. Esta variante se caracteriza por la presencia de síntomas sensitivos más prominentes y características axonales en la electrofisiología, en ausencia de rasgos desmielinizantes y que afectan tanto a las fibras motoras como a las sensitivas. Los anticuerpos antigangliósido asociados a la variante AMSAN son, al igual que la variante AMAN, GM1 y GD1a de forma predominante y su pronóstico también es peor que el de la forma desmielinizante clásica(100).

2.2.2.1.3. *Formas sensitivas puras y atáxicas*

Aunque menos frecuentes que las variantes sensitivo-motoras o las predominantemente motoras, se acepta la existencia de formas de SGB sensitivas puras y atáxicas. Dentro de ellas la más frecuente es el Síndrome de Miller-Fisher (SMF), descrito en 1956 y caracterizado por la presencia de la triada clásica oftalmoparesia, ataxia y arreflexia(101). La identificación del SMF como variante del SGB vino determinada por su instauración rápida tras un cuadro infeccioso precedente, la evolución monofásica, la presencia de disociación albúmino-citológica y la respuesta a terapias inmunomoduladoras. Dentro del SMF, a su vez, pueden encontrarse formas parciales con ataxia sin oftalmoparesia u oftalmoparesia aislada y formas con solapamiento variable con las formas clásicas de SGB, con afectación de miembros o de pares craneales(102). Una variante de SMF en la que existe afectación central, generalmente en forma de alteración del nivel de consciencia o alteración de vías largas, es la encefalitis de Bickerstaff(103). Comparte la triada clásica con el SMF pero presentan además lesiones de aspecto inflamatorio en el tronco del encéfalo que son las responsables de la clínica central de los pacientes. El SMF (y sus variantes menores) se caracterizan por presentar con una frecuencia superior al 90% anticuerpos de la clase IgG contra los gangliósidos GQ1b en la que es la correlación clínico-inmunológica más sólida en las neuropatías inmunomediadas(103). En la mayor parte de los casos esta reactividad se acompaña de reactividad cruzada contra el gangliosido GT1a, que comparte con el anterior un epítipo determinado por reactividad contra epítipo terminal común en ambos gangliósidos constituido por dos residuos

de ácido siálico unidos a un residuo galactosa (NeuNAcNeuNAcGal; Figura 7).

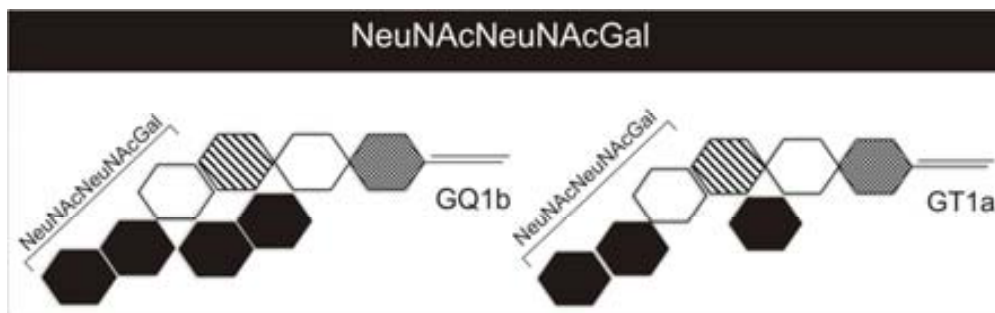


Figura 7. Estructura de los gangliósidos GQ1b y GT1a que contienen el epítipo común NeuNAcNeuNAcGal. Cortesía Ricardo Rojas / René Robles.

Por otro lado la descripción de las primeras series de casos con formas sensitivas puras de SGB es mucho más reciente y su número mucho menos frecuente. No es hasta 2001 que una serie bien caracterizada de pacientes con un cuadro polineuropático subagudo, precedido de antecedente infeccioso y con disociación albumino-citológica fue orientado como una variante de SGB(104). La evidencia disponible sobre la existencia de una variante sensitiva de SGB se resumen en publicaciones de casos aislados o pequeñas series(104, 105), alguno de los cuales se presentaba, además de con el trastorno sensitivo, con ataxia y signo de Romberg positivo y que recibe diversas denominaciones, siendo la más aceptada la de neuropatía sensitivo-atáxica aguda (ASAN)(104-107). La presencia de Romberg positivo sugiere que la ataxia en la ASAN, a diferencia de en el SMF o en el SGB atáxico descrito por Richter(108), en el que el signo de Romberg es negativo, es de origen periférico, mientras en el SGB atáxico parece de origen cerebeloso(109, 110). Sin embargo, la

clasificación de las neuropatías atáxicas como entidades diferentes en función de la presencia o no de semiología que oriente al origen central o periférico de la ataxia es controvertida y está en discusión si la ASAN pertenece también al espectro clínico del SGB de forma diferente al SGB atáxico o si ambos son la misma entidad clínica(107). La presencia de antecedente infeccioso y de disociación albúmino-citológica sugiere que la ASAN es también una variante de SGB pero el patrón de reactividad antigangliósido, como demostraremos más adelante, ayuda a decantarse por que ASAN y SGB atáxico son, en realidad, entidades diferenciadas dentro de la amplia heterogeneidad clínica del SGB.

2.2.2.1.4. *Variantes loco-regionales*

Además de las formas frustrés de SMF o SGB en las que sólo una parte de los síntomas característicos es evidente, se han descrito variantes de SGB regionales de las cuales la más característica es la descrita por Ropper y caracterizada por la presencia de parálisis orofaríngea, de la musculatura cervical y braquial proximal (sin que haya afectación a otros niveles como en el SGB clásico) y que recibe el nombre de parálisis faringo-cérvico-braquial(111-113). Esta variante de SGB también presenta rasgos desmielinizantes en la neurografía y disociación albúmino-citológica y se asocia de forma característica a la presencia de anticuerpos contra el gangliósido GT1a. Aunque en el SMF o en la encefalitis de Bickerstaff puede existir reactividad contra GT1a, ésta parece secundaria a una reactividad cruzada con GQ1b, como demuestran los experimentos de inhibición. Sin embargo, la presencia de GT1a aislada parece asociarse de forma específica con la

variante faringo-cérvico-braquial en un nuevo ejemplo de correlación clínico-inmunológica específica.

2.2.2.2. Neuropatías autoinmunes crónicas

2.2.2.2.1. *Poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (y variantes)*

La CIDP es una enfermedad poco frecuente, con una prevalencia reportada entre 0.8 y 8 pacientes por 100.000 habitantes. A pesar de ello es la neuropatía inflamatoria crónica más frecuente(114). Aunque desde los años 50 se conoce la existencia de una neuropatía desmielinizante que responde a inmunosupresores, no es hasta los años 70 cuando se caracteriza la enfermedad de manera más detallada(115, 116). Aunque es una enfermedad tratable con relativo éxito en la mayoría de los pacientes, hasta el 50% de los pacientes presenta una discapacidad significativa (117). De la misma manera que en el SGB, en la CIDP se identifican varios patrones clínicos(118). Uno de ellos, más frecuente y en el que se basan los criterios diagnósticos es considerado el patrón típico o clásico y que consiste en la existencia de debilidad de predominio proximal en miembros, alteraciones sensitivas distales con patrón polineuropático y arreflexia y que se instaura, de forma simétrica, en un periodo superior a los 2 meses. Sin embargo, más allá de las formas clásicas, que suponen aproximadamente el 75% de todas las CIDP(119), existen variantes clínicas que incluyen formas motoras, sensitivas o atáxicas puras, formas asimétricas o focales (como la variante Lewis-Sumner)(120), formas con afectación predominante distal (variante DADS)(121) o con afectación del SNC. Además, incluso dentro de las

variantes típicas, pueden observarse pacientes con evolución recurrente-remitente o escalonada y pacientes con una evolución lentamente progresiva, también pacientes que tienen una gammapatía monoclonal IgG o IgA asociada (en torno al 10%) y pacientes sin ella y pacientes con afectación de pares craneales o sin ella(118). Finalmente, aunque la respuesta al tratamiento inmunomodulador es buena en la mayoría de los casos, existen pacientes que no responden a corticoides o IVIg, que son los dos tratamientos estándar(122-125).

El diagnóstico de la CIDP se realiza en base a unos criterios clínicos relativamente amplios y en la existencia de criterios electrofisiológicos de desmielinización(118), aunque la presencia de degeneración axonal puede ser evidente en algunos pacientes desde el inicio y en otros aparece secundariamente a la desmielinización sostenida tras años de evolución de la enfermedad. Además de la electrofisiología, la presencia de disociación albúmino-citológica, como en el SGB, es otro criterio de apoyo al diagnóstico de la CIDP. La amplitud en los criterios diagnósticos y la posibilidad de incluir como CIDP probable o posible a aquellos pacientes que cumplan sólo parte de los criterios diagnósticos, determina una amplia variabilidad fenotípica en el grupo de pacientes con CIDP(118).

Los corticoides tanto orales en régimen estándar a 1mg/kg/d como en pulsos en dosis altas, las IVIg y la plasmaféresis son los 3 tratamientos que han demostrado su efectividad en el tratamiento de la CIDP a corto y medio plazo(118, 123-129). Además, se utilizan, bien como tratamientos ahorradores de corticoides o IVIg o como

inmunosupresores de base, varios inmunosupresores clásicos (ciclosporina, metotrexate, micofenolato de mofetilo) aunque la evidencia es escasa en favor de su uso(130). También se han demostrado eficaces en series de casos el rituximab(131-133) y la ciclofosfamida(134, 135), aunque se reservan para aquellos pacientes que no responden a las terapias convencionales por sus efectos adversos potencialmente graves.

A pesar de que la CIDP puede determinar una discapacidad significativa en hasta la mitad de los pacientes a largo plazo también es conocido que un porcentaje en torno al 30% de pacientes remite completamente a largo plazo o no presenta nuevos brotes de la enfermedad. Esto ha sido descrito tanto en series retrospectivas de casos(136, 137) como en un ensayo clínico aleatorizado con IVIg en el que, a pesar de no administrarse nuevas infusiones de IVIg más allá de 24 semanas, hasta un 40% de pacientes se mantuvieron en remisión clínica(127).

2.2.2.2.2. *Polineuropatía asociada a gammapatía monoclonal IgM*

El hallazgo de una gammapatía monoclonal en los pacientes con polineuropatía es relativamente frecuente. Hasta el 10% de pacientes con una polineuropatía de origen incierto tienen una gammapatía monoclonal(138). Sin embargo no todos los pacientes con gammapatía monoclonal desarrollan una polineuropatía (este porcentaje ha sido estimado entre un 5 y un 28%)(139). Aunque la gammapatía monoclonal más frecuente es la IgG, la que con mayor frecuencia se asocia a polineuropatía es la IgM. Hasta el 50% de los pacientes con una gammapatía monoclonal IgM desarrollarán una

polineuropatía en el curso de su gammapatía(52, 140). Aunque la presencia de gammapatía monoclonal de cualquier subclase puede asociarse al desarrollo de una neoplasia de células de linaje B (mieloma múltiple, leucemias o linfomas de células B, etc) en la mayor parte de los casos no se acompañan de neoplasia asociada y reciben el nombre de gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS en sus siglas en inglés). A pesar de ello, las MGUS presentan un riesgo anual de transformación neoplásica de hasta el 1%(141). Aunque la presencia de gammapatía monoclonal IgG o IgA puede asociarse a una polineuropatía desmielinizante, esta polineuropatía, tanto desde el punto de vista fenotípico como de respuesta a tratamiento, forma parte del espectro de la CIDP(142). La presencia de gammapatía IgG o IgA no es criterio de exclusión en el diagnóstico de la CIDP. Sin embargo las gammapatías monoclonales IgM, de las cuales hasta el 50% presentan reactividad contra la proteína asociada a la mielina (MAG), presentan unas características clínicas y de respuesta al tratamiento que las diferencian de la CIDP y se clasifican, a todos los efectos, como una entidad diferenciada(141).

La polineuropatía asociada a gammapatía monoclonal IgM (MGUS-P) presenta un fenotipo similar a la variante DADS de la CIDP, con una evolución lenta, simétrica, con afectación motora distal pero predominio sensitivo marcado, especialmente con afectación de la sensibilidad propioceptiva, ataxia y, muy frecuentemente, temblor de acción. Existen, al igual que en los grupos precedentes, otros fenotipos de polineuropatías asociadas a gammapatía monoclonal IgM. Así, el CANOMAD, una polineuropatía con características

similares al SMF (oftalmoparesia, ataxia y arreflexia), presenta gammapatía monoclonal IgM cuya reactividad está dirigida contra epítomos disialosil (anti-GD1b y GQ1b IgM)(143). El síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y afectación cutánea) también asocia una gammapatía monoclonal IgM a una polineuropatía de predominio sensitivo con características desmielinizantes prominentes y degeneración axonal secundaria(144).

En el diagnóstico de MGUS-P es fundamental la determinación de anticuerpos anti-MAG. La presencia de títulos elevados de anti-MAG mediante la técnica de inmunofijación en el contexto de una polineuropatía desmielinizante de predominio distal y sensitivo es definitiva(141). La mayor parte de los pacientes, igual que en el SGB y la CIDP, presentan además disociación albúmino-citológica en el LCR, aunque si la sospecha es alta y los anti-MAG resultan positivos no suele ser necesaria su realización. Aparte del diagnóstico de la polineuropatía es fundamental en el momento de la detección de ésta, realizar un despistaje de la presencia de neoplasia asociada. Así, aparte de la determinación de los niveles de inmunoglobulinas en sangre, es necesaria la realización de, hemograma y VSG, proteinuria de Bence-Jones, función renal, serie ósea y, si fuera necesario, aspirado de médula ósea(141).

No existe un tratamiento que se haya demostrado efectivo de forma evidente en la MGUS-P. En pacientes sin discapacidad significativa, en general, se recomienda no utilizar terapia inmunomoduladora o inmunosupresora. Aunque la evidencia es insuficiente, en caso de

rápido deterioro neurológico, se recomienda la utilización de IVIg o plasmaféresis(145). El rituximab parece ser efectivo en algunos pacientes, aunque el beneficio obtenido a medio plazo es discreto y, en general, no se recomienda su uso de forma generalizada(146-151).

2.2.2.2.3. *Neuropatía motora multifocal*

La NMM fue caracterizada como entidad diferenciada en los años 80, gracias a la descripción de un subgrupo de pacientes con un síndrome de segunda neurona motora, lentamente progresivo y en los que existían bloqueos de la conducción en el estudio neurográfico de los nervios motores(152, 153). Más adelante se describió la respuesta a inmunosupresores de este subgrupo de pacientes y, por tanto, su probable naturaleza autoinmune(154).

La NMM es una enfermedad poco frecuente, con una prevalencia aproximada de 0.5-2/100.000hab, con predominio en varones respecto a mujeres (2.6:1) y que aparece entre la 3ª y 6ª décadas de la vida en el 80% de los pacientes(153). Se caracteriza por la presencia de debilidad de aparición lenta y progresiva, asimétrica, con afectación predominante en miembros superiores y con atrofia y fasciculaciones con distribución anatómica de nervio periférico y sin síntomas sensitivos (o éstos son mínimos). Entre los criterios de exclusión para el diagnóstico de NMM se encuentran el hallazgo de síntomas o signos de primera neurona motora, la afectación bulbar marcada, la presencia de debilidad difusa evidente en las primeras semanas y la afectación sensitiva evidente, todas ellas características que orientan a la presencia de otras enfermedades diferentes a la NMM(155).

La característica diagnóstica clave de estos pacientes es la presencia de bloqueos de la conducción en la neurografía motora fuera de los sitios habituales de compresión(155). Sin embargo, aunque la presencia de bloqueos de la conducción en la neurografía motora orienta definitivamente el diagnóstico, existe un subgrupo de pacientes, con bloqueos parciales o sin bloqueos de la conducción evidentes y que, sin embargo, presentan algunas características sugestivas de desmielinización focal (dispersión temporal del potencial, enlentecimiento de las velocidades de conducción...) y responden al tratamiento con inmunoglobulinas endovenosas y que, por esta razón, son incluidos bajo la categoría diagnóstica de NMM sin bloqueos de la conducción(156, 157). La presencia de signos de denervación difusa que exceden el territorio de los nervios en los que se encuentran bloqueos de la conducción, es casi universal en los pacientes con NMM. Por esta razón, especialmente en aquellos pacientes en los que los bloqueos de la conducción no son evidentes, el diagnóstico diferencial incluye a la esclerosis lateral amiotrófica o la atrofia muscular progresiva, enfermedades para las que, a diferencia de la NMM, no existe tratamiento y cuyo pronóstico es mucho peor(152). En hasta el 50% de los pacientes con NMM pueden detectarse anticuerpos anti-GM1 de la subclase IgM(153), lo que, especialmente en los casos en los que la presencia de bloqueos de la conducción no sea evidente, puede ayudar en el diagnóstico. A diferencia del resto de neuropatías desmielinizantes la presencia de disociación albúmino-citológica no es una característica frecuente en los pacientes de NMM(155).

En el tratamiento de la NMM el pilar fundamental son las IVIg, cuya efectividad ha quedado demostrada tanto en series de casos como en ensayos aleatorizados(158). Se ha publicado que la ciclofosfamida podría ser efectiva, aunque sus potenciales efectos secundarios la relegan a tratamiento de rescate en caso de que las IVIg no sean efectivas (155). El recambio plasmático no ha demostrado eficacia en la NMM y, de forma interesante, se ha reportado en varios estudios que el tratamiento con esteroides no sólo no es eficaz sino que en algunos pacientes puede llegar a ser deletéreo(159, 160).

A pesar de que el tratamiento con IVIg se mantiene eficaz durante todo el curso de la enfermedad, la duración de la enfermedad es un factor clave en la respuesta. A mayor duración de la enfermedad menor es el efecto que determinan las IVIg, probablemente por aparición de daño axonal sobre el cual las IVIg no tienen efecto alguno(161). Independientemente de la efectividad de las IVIg en la NMM a corto y medio plazo el deterioro progresivo de la destreza manual y de las habilidades motoras es una característica constante en los pacientes con NMM de varios años de evolución, por lo que, a largo plazo, la NMM puede determinar una discapacidad significativa(162).

2.2.3. Inmunopatogenia del SGB y la CIDP

La inmunopatogenia de las neuropatías autoinmunes es relativamente desconocida. Aunque existen descripciones patológicas centradas en estudios con biopsias de nervio sural de pacientes, la mayor parte de los conocimientos acerca del papel de los diferentes subtipos celulares inmunes en las neuropatías inmunomediadas se basan en extrapolaciones de los estudios en el modelo

animal neuritis alérgica experimental (EAN). El difícil acceso al tejido implicado (nervios y raíces) y la progresiva sustitución de la biopsia de nervio sural por métodos no invasivos para el diagnóstico han hecho que el conocimiento de las alteraciones del nervio en estas enfermedades sea relativamente escaso.

2.2.3.1. Inmunopatogenia del SGB

2.2.3.1.1. *Histopatología*

La mayor parte de estudios de la patología del SGB son estudios clásicos en los que el análisis fundamental es descriptivo. Haymaker y Kernohan realizaron una descripción de la patología del SGB partiendo de necropsias de 50 pacientes con la enfermedad. La primera conclusión del estudio es que la patología es más prominente cuánto más proximal es el segmento analizado y, especialmente, en la porción radicular dónde la raíz motora y sensitiva se unen(163). El hallazgo fundamental se refería a la presencia de edema, desmielinización y daño axonal y la presencia de células inflamatorias fue interpretada como un signo de reparación. Krucke describió una serie de 9 necropsias con SGB en la que propuso que el edema y el infiltrado celular formaban parte en realidad de la patogenia de la enfermedad y propuso que el SGB es, en realidad, una neuropatía inflamatoria(164). Un trabajo seminal llevado a cabo por Asbury y colaboradores describió la presencia de un infiltrado mononuclear precoz en todos los pacientes estudiados, la posibilidad de que se afecte cualquier segmento del nervio periférico, de la raíz a las ramas terminales, la coincidencia de la desmielinización segmentaria y daño axonal con las zonas en las que se encontraban los infiltrados inflamatorios y la ausencia de diferencias entre los casos lentamente

progresivos (lo que posteriormente fueron clasificados como CIDP) y los casos agudos (SGB propiamente dicho)(165). El hallazgo más consistente en la biopsia del nervio sural de pacientes con SGB es la presencia de desmielinización segmentaria que ocurre en relación a infiltrados inflamatorios. A diferencia de las series basadas en autopsias la presencia de infiltrados inflamatorios no es tan prominente en el nervio sural y sólo es visible en aproximadamente el 40% de los pacientes, según Prineas y Oh(164, 166). El hallazgo más específico de las neuropatías inflamatorias es la presencia de infiltrados inflamatorios en el espacio endoneural, lo cual constituye la base para discriminar entre las neuropatías inflamatorias desmielinizantes de las neuropatías vasculíticas. Los infiltrados inflamatorios consisten tanto en células de la estirpe monocítica como en linfocitos y células plasmáticas y generalmente se localizan en espacios perivenulares. Aunque el hallazgo primario y más frecuente es la desmielinización en hasta el 80% de los pacientes presentan signos de degeneración axonal, especialmente en aquellas zonas en los que la desmielinización es más prominente, motivo por el cual se asume que el daño axonal es secundario(166-168).

Existe discusión al respecto de los hallazgos patológicos en las variantes motoras exclusivas del SGB. Aunque algunos autores proponen un modelo de daño causado por anticuerpos GM1, existe controversia respecto a la capacidad de los anticuerpos de determinar el daño axonal por si mismos(169-172). Desde el punto de vista patológico y concordando con los estudios necrópsicos iniciales en los que se describía la presencia de edema perineural como

hallazgo más prominente con mayor afectación de los segmentos proximales, cabe destacar la visión de Berciano y colaboradores. Los autores proponen que la presencia de inflamación y edema prominentes en la raíz motora que son los que, secundariamente, determinarían un aumento de presión endoneural y daño isquémico en el axón con degeneración walleriana secundaria a nivel distal(173, 174).

Más recientemente, utilizando estudios de inervación cutánea ha sido descrita una disminución importante de la densidad de fibras intra-epidérmicas (incluso en variantes motoras puras del SGB) que, además, correlaciona con la presencia de dolor en la anamnesis(175). Usando una aproximación similar Ruts y colaboradores además de confirmar una reducción en la densidad de fibras epidérmicas en los pacientes con SGB, han descrito la presencia de daño mielínico y axonal acompañados de infiltrados inflamatorios en las fibras intradérmicas mielinizadas(176).

2.2.3.1.2. Autoanticuerpos y mímica molecular

Los infiltrados inflamatorios en el SGB están predominantemente compuestos de macrófagos y células T, tanto CD4 como CD8(33). Sin embargo la característica patogénica más específica del SGB, especialmente en las variantes motoras de la enfermedad, es la presencia de anticuerpos antigangliósido(51). La prácticamente invariable presencia de un antecedente infeccioso o vacunal que precede en poco tiempo al desarrollo de la neuropatía sugería una relación causal entre el antecedente infeccioso y la patogenia autoinmune, hipótesis que, tras el descubrimiento de los anticuerpos

antigangliósidos es ampliamente aceptada(53). El agente infeccioso asociado con SGB y mejor caracterizado es el *Campylobacter*, aunque otros patógenos como *Mycoplasma*, *Haemophilus* o el citomegalovirus también se asocian de forma característica al desarrollo de SGB(78). De la misma forma, algunas vacunas también han sido descritas como precipitantes de SGB. Esta relación directa con un antecedente infeccioso ha llevado a proponer la teoría de la mímica molecular entre antígenos del agente infeccioso y el nervio periférico como mecanismo patogénico en el SGB. Esta teoría ha sido demostrada por Yuki y colaboradores en las variantes AMAN del SGB(96). Una infección por *Campylobacter* determinaría la aparición de anticuerpos contra el lipooligosacárido (LOS) de la pared celular de la bacteria. Este LOS es estructuralmente idéntico a algunos epítomos del gangliósido GM1 y del GD1a presentes en el nervio y unión neuromuscular (Figura 8).

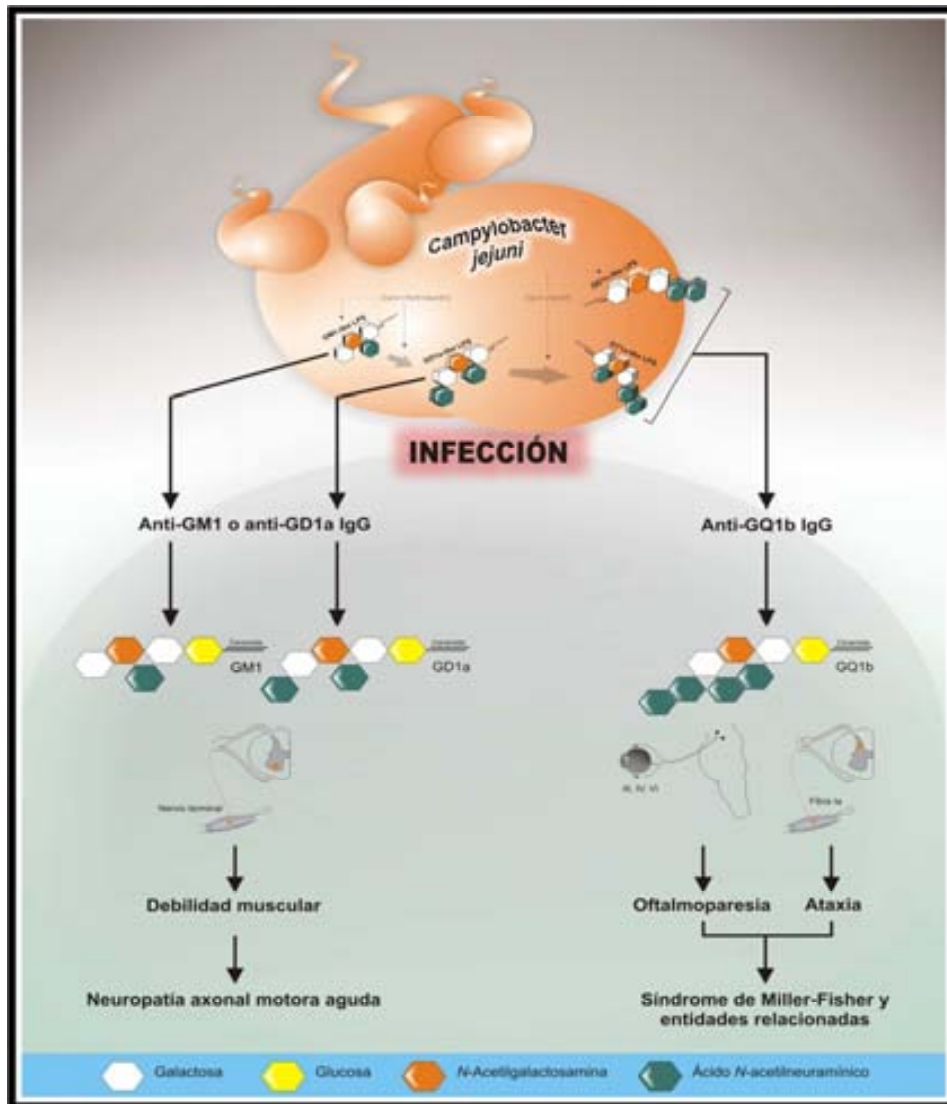


Figura 8. Fenómeno de mímica molecular por el cual la presencia de una estructura de lipooligosacárido de membrana bacteriana en *Campylobacter* similar a los gangliosidos GM1, GD1a o GQ1b, puede determinar reacción cruzada por anticuerpos contra el nervio periférico. Cortesía Ricardo Rojas/René Robles.

De hecho la presencia de cepas de *Campylobacter* con enzimas (cst-II) capaces de transferir residuos de ácido siálico (presentes en GM1 y GD1a) al LOS de la pared bacteriana se ha relacionado con un aumento de las probabilidades de desarrollar SGB(177). Un estudio reciente sugiere que la sialilación influye de forma determinante en el reconocimiento del LOS por el receptor "toll-like" 4 (TLR4) de la

inmunidad innata. Estos receptores, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, son la primera línea de defensa ante la invasión por un patógeno y, por tanto, son claves en la iniciación y mantenimiento de una respuesta inmune. El hecho de que el TLR4 determine una respuesta proliferativa en las células B más acentuada con las cepas de *Campylobacter* que poseen cst-II sugiere que probablemente la aparición de autoinmunidad en esas cepas no estaría sólo relacionada con la mímica molecular entre el LOS y los gangliósidos, sino también con el nivel de señal co-estimuladora que proporcionen los receptores de la inmunidad innata(178). De hecho, el SGB se asocia a la presencia de polimorfismos en el TLR4, lo que apoyaría la idea de que la mímica molecular no es el único factor determinante(179). La prueba más directa es la descripción por Illa y colaboradores de un SGB axonal motor en 7 pacientes tras la inyección de gangliósidos parenterales(180). La ausencia de anticuerpos antigangliósido y de neuropatía en otros individuos tratados con el mismo preparado de gangliósidos parenterales sugieren por tanto que, además de los factores extrínsecos, son necesarios para el desarrollo de SGB factores de susceptibilidad individual entre los que podrían encontrarse estos polimorfismos en la inmunidad innata.

Independientemente del proceso que lleve a la generación de anticuerpos antigangliósido en primer lugar, parece claro que tienen potencial patogénico(51). Se ha propuesto que los autoanticuerpos y el depósito de complemento sobre las células de Schwann son el primer elemento visible en el SGB(171, 181, 182). Los infiltrados

celulares no aparecerían hasta una semana después, probablemente para fagocitar los elementos celulares dañados por la activación del complemento. Esto podría explicar por qué, a pesar de que los infiltrados celulares son una característica frecuente en el SGB, no aparecen de forma universal a pesar de la presencia de síntomas evidentes. Aunque todas las variantes de SGB presentan antecedente infeccioso, un patrón de evolución temporal predecible y unos hallazgos en el LCR similares entre todos los subgrupos, los mecanismos patogénicos y los antígenos diana son diferentes para las distintas variantes del SGB.

La determinación de anticuerpos antigangliósido ayuda a confirmar la naturaleza autoinmune de la neuropatía estudiada pero, sobre todo, permite, dependiendo del patrón de reactividad, establecer asociaciones clínico inmunológicas. Por qué la reactividad ante determinados gangliósidos sucede en un tipo de neuropatías con mayor frecuencia que en otras depende esencialmente de dos cosas. En primer lugar, como veíamos previamente, del agente infeccioso precipitante de la neuropatía. Y en segundo lugar de la localización o abundancia relativa de cada gangliósido en los diferentes elementos del sistema nervioso periférico. Así, por ejemplo, es conocida la presencia abundante de GM1, asociado generalmente a variantes motoras de neuropatías autoinmunes, en las raíces anteriores y no tanto en las raíces dorsales(183). Los anticuerpos contra GQ1b se asocian a SMF, en el que la oftalmoparesia y la ataxia son prominentes, y GQ1b se encuentra de forma más abundante en los nervios motores oculares(184). Aunque la reactividad antigangliósido

puede ir dirigida contra un único gangliósido, en multitud de ocasiones, la reactividad es poliespecífica debido a la presencia de epítomos idénticos en gangliósidos diferentes (Figura 9).

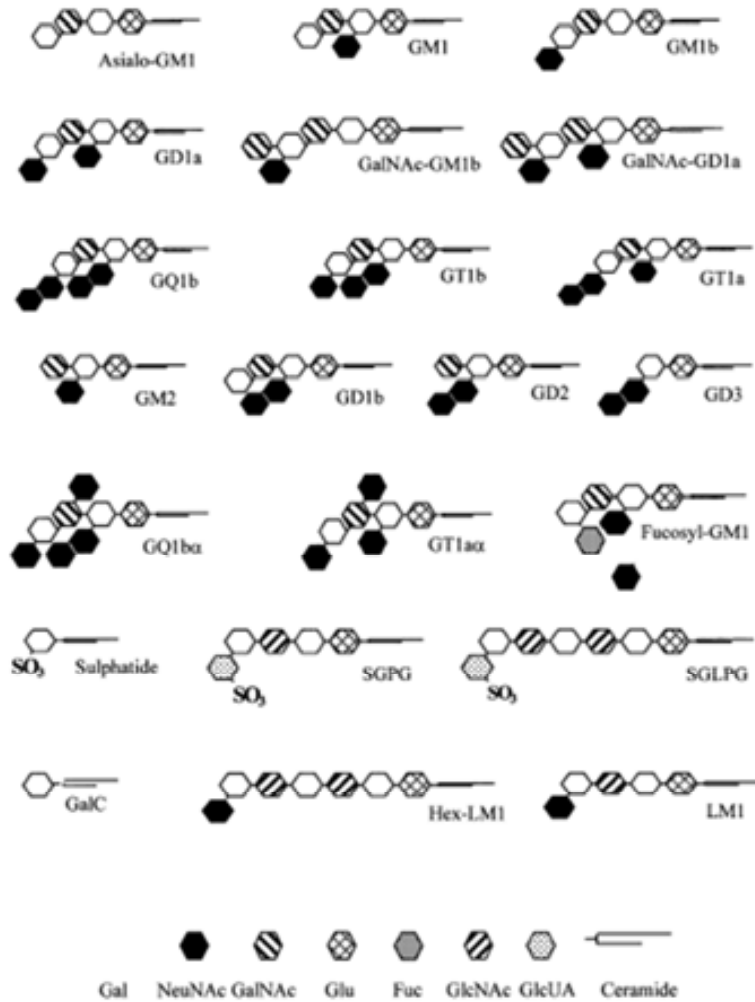


Figura 9. Estructura de los gangliósidos. Extraída de Willison y Yuki(51).

Por ejemplo, GD1b, GQ1b, GT1b, GD2 y GM3 comparten un epítomo disialosil (Figura 10). Los pacientes con variantes sensitivo-atáxicas, como describiremos más adelante, se asocian a la presencia de anticuerpos dirigidos contra el epítomo disialosil, lo que determina que puedan tener reactividad, en mayor o menor medida, contra cualquiera de los gangliósidos expuestos. Esta asociación se explica

por la abundante presencia de gangliósidos con epítipo disialosil en el ganglio raquídeo dorsal y raíces posteriores(185).

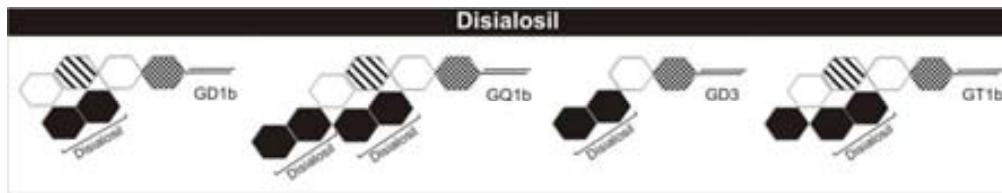


Figura 10. Gangliósidos que poseen epítipo disialosil en su estructura. Cortesía Ricardo Rojas / René Robles

En multitud de ocasiones los cuadros no son puros completamente y a la presencia de anticuerpos de una reactividad concreta se pueden unir otras reactividades. Por ejemplo, la presencia de reactividad aislada contra el epítipo NeuNAc(alpha2-3)Gal fue descrita en un paciente con afectación bulbar aislada(186). Posteriormente, revisando los pacientes con dicha reactividad, independientemente de la presencia de otras reactividades u otros síntomas, se descubrió su asociación a la parálisis de la musculatura bulbar(187). Esto pone de relieve que, a pesar de que el SGB se manifiesta como un espectro de síndromes variados, la presencia de reactividades antigangliósido concretas se asocia a fenotipos clínicos específicos, solos o en combinación con otros. Más recientemente ha sido descrita la presencia de anticuerpos contra complejos de gangliósidos(188). Se trata de anticuerpos cuya reactividad no es detectada cuando se ensayan, mediante ELISA o cromatografía de capa fina, gangliósidos aislados pero que sin embargo aparecen cuando se realizan ELISAs de gangliósidos en combinación. El fundamento teórico de estos experimentos radica en que, de la misma manera que epítipo idénticos presentes en diferentes gangliósidos determinan

reactividades cruzadas, la presencia de combinaciones de gangliósidos podría hacer aparecer epítomos relevantes no presentes si los gangliósidos se testan individualmente. Todavía existe relativa controversia al respecto pero la determinación de la reactividad contra complejos antigangliósido ha contribuido a aumentar el porcentaje de pacientes en quienes se detecta positividad de anticuerpos contra glicolípidos(188).

Sorprendentemente, a pesar de que la AIDP es la variante más frecuente en el medio occidental, las variantes cuya patogenia es más conocida son las axonales (particularmente AMAN) y el SMF. Aunque los mecanismos exactos que llevan al daño del nervio gracias a los anticuerpos antigangliósido son desconocidos, el mecanismo más estudiado y considerado principal es la unión de complemento. En el AMAN los autoanticuerpos contra el gangliósido GM1 se unen al axolema (en lugar de a la célula de Schwann) en la región del nodo de Ranvier y allí determinan la unión y activación del complemento, aunque la patogenicidad de dicho mecanismo está en entredicho(169-172). La desintegración de la membrana a nivel del nodo de Ranvier determinaría la separación de las células de Schwann y el axón en la región paranodal y, por tanto, un aumento del espacio nodal al que seguiría la degeneración axonal, sin que sea necesaria la presencia de infiltrados inflamatorios para determinar la destrucción de la fibra nerviosa en estos subtipos. Sea o no gracias a un mecanismo mediado por complemento, parece que los anticuerpos anti-GM1 pueden contribuir en la desorganización de las estructuras del nodo de Ranvier y, secundariamente, al bloqueo de la conducción

nerviosa, aunque los mecanismos precisos que llevan a esto no se conocen con precisión. Los anticuerpos antiGQ1b presentes, entre otros, en el SMF determinan daño y bloqueo funcional de la unión neuromuscular (que es su sitio de unión mejor estudiado). Así es conocido que los anticuerpos contra GQ1b determinan una liberación masiva de acetilcolina en el terminal motor determinando el bloqueo de la conducción a este nivel(54). Este efecto parece enteramente determinado por la unión del complemento como demuestra que la patogenicidad de anti-GQ1b desaparezca cuando se administra, en modelos animales, fármacos inhibidores del complemento como eculizumab (anticuerpo monoclonal contra C5)(189). El modelo clásico de patogenicidad de los anticuerpos antigangliósido es el desarrollado por Kusunoki y colaboradores(55, 190). Como se ha explicado previamente las reactividades contra GD1b se asocian a neuropatías sensitivo atáxicas, tanto crónicas como agudas. Los autores hipotetizaron que la inmunización de un modelo de conejo con gangliósidos GD1b determinaría la aparición de un síndrome sensitivo-atáxico en los animales. Hasta el 50% de los animales inmunizados desarrollaron anticuerpos de la clase IgM e IgG y alteraciones sensitivas y ataxia. En los estudios patológicos las alteraciones principales fueron observadas en las raíces posteriores y en el ganglio raquídeo dorsal, dónde era evidente la pérdida axonal y de somas neuronales, a pesar de no existir infiltrados inflamatorios(55, 190). Desde entonces modelos similares han sido desarrollados para otros gangliósidos, corroborando la correlación de

las diferentes reactividades antigangliósido con fenotipos específicos de neuropatía(Figura 11) (191, 192).

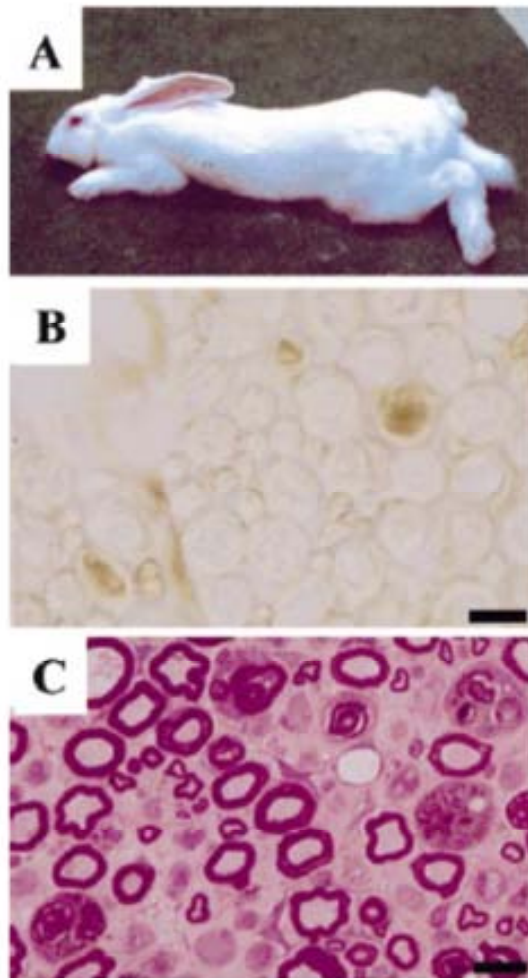


Figura 11. Modelo animal de SGB, variante AMAN, mediante la inmunización contra GM1. (A) Muestra tetraparesia flácida en el conejo inmunizado. (B) Muestra depósitos de IgG en la raíz anterior. (C) Muestra reducción en el número de fibras mielínicas gruesas con degeneración axonal walleriana en algunas de ellas. Extraída de Willison y Yuki(51).

En resumen, aunque la inmunidad celular juega, probablemente, un papel importante en el SGB, los datos clínicos y experimentales disponibles actualmente, sugieren un predominio evidente de

alteraciones humorales en el SGB y variantes, de ahí la importancia de su estudio y del establecimiento de correlaciones clínico-inmunológicas atendiendo a las reactividades de anticuerpos antigangliósido.

2.2.3.2. Inmunopatogenia de la CIDP

2.2.3.2.1. *Histopatología*

De la misma forma que en el SGB, el hallazgo fundamental en los estudios patológicos en la CIDP es la presencia de desmielinización segmentaria. La existencia de imágenes en “bulbo de cebolla” en la microscopía electrónica, característica de patologías en las que existe un proceso activo de desmielinización-remielinización, distingue la patología del SGB y de la CIDP que, por otro lado, comparten la mayoría de características patológicas(115, 116, 164).

Los infiltrados inflamatorios en la CIDP son menos prominentes que en el SGB. Los infiltrados, acompañados o no de edema endoneural o subperineural, son más evidentes a nivel subperineural que endoneural.

Dependiendo de las series la frecuencia de infiltrados de células mononucleares en las biopsias de nervio sural varía entre el 11 y el 65%(115, 164). Igual que en el SGB la presencia de degeneración axonal es una característica relativamente frecuente, afectando hasta el 25% de los pacientes(115). En los casos analizados mediante autopsia la característica más prominente fue la presencia de infiltrados inflamatorios, especialmente en los segmentos proximales de los nervios y en las raíces, aunque el número de casos descritos es relativamente pequeño y la muestra sesgada hacia aquellos de mayor gravedad(164).

Aunque no se utilizan en la evaluación rutinaria de las biopsias de nervio sural con criterios diagnósticos, también ha sido descrita la presencia de depósitos de inmunoglobulinas y complemento en la superficie de los nervios de pacientes con neuropatías autoinmunes y, en particular, de la CIDP(193).

Estudios recientes tanto en biopsias de nervio sural como en biopsias de piel han puesto de manifiesto la existencia de alteraciones en la región del nodo de Ranvier en las fibras mielinizadas. Cifuentes-Diaz y colaboradores describieron la desestructuración del patrón de tinción

inmunohistoquímico de diversas proteínas del nodo de Ranvier

(fundamentalmente CASPR1/paranodin) que aparecían diseminadas a lo largo de todo el espacio internodal, en lugar de estar localizadas de forma exclusiva en el paranodo(194). Estas alteraciones no estaban presentes en neuropatías axonales idiopáticas hasta el punto de que los autores proponen que las alteraciones en el patrón de tinción de CASPR1/paranodin pueden tener utilidad en el diagnóstico de la CIDP.

Hallazgos similares han sido descritos por el grupo de Sommer, en este caso, en biopsias de piel de pacientes con CIDP. Todos los pacientes (n=5) que cumplían criterios de CIDP definida presentaban alteraciones en la región nodal en las fibras mielinizadas. Todos los pacientes presentaban, de forma significativa, dispersión del patrón de tinción de CASPR1 y el 80% de ellos mostraban elongación del espacio nodal o alteración en el patrón de tinción de neurofascina. Estos hallazgos, sin embargo, no estaban presentes en controles sanos o, incluso, en pacientes con neuropatías hereditarias como el Charcot-Marie-Tooth (CMT) o la adrenomielseuropatía(195). Saporta y colaboradores, en un trabajo

dirigido al estudio de las anomalías de las fibras mielinizadas en la biopsia de piel de pacientes con CMT encontraron en el grupo de CIDP usado como control, hallazgos similares a los reportados por el grupo de Sommer, aunque, en lugar de analizar la longitud y patrón de alteración del espacio nodal y paranodal, estudiaron la longitud del espacio internodal. El espacio internodal, es decir, el espacio ocupado por la célula de Schwann mielinizante, como es de esperar atendiendo a los resultados de Cifuentes-Díaz y Sommer, se encontraba reducido (probablemente en favor de un espacio nodal más amplio o disperso, aunque esto no era el motivo de estudio del estudio de Saporta)(196).

Estos hallazgos ponen de relieve la importancia del nodo de Ranvier y estructuras relacionadas en la patogenia de la CIDP y apoyan que la respuesta inmune pueda estar dirigida contra proteínas localizadas en dichas estructuras(197).

2.2.3.2.2. *Inmunidad celular*

En la patogenia de la CIDP tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral juegan un papel fundamental(198). La existencia de infiltrados inflamatorios en la biopsia de nervio sural entre los que predominan los monocitos pero en los que también se encuentran linfocitos T CD4+ y CD8+ apoya esta idea. Estos linfocitos CD4+ o CD8+ se encuentran en proporciones variables en las biopsias de nervio sural de pacientes con CIDP y, en general, su receptor de célula T (TCR) es del tipo $\alpha\beta$ (199-202).

Localmente los linfocitos activados secretan metaloproteasas que permiten el avance disgregando la matriz extracelular(203). Citocinas proinflamatorias y defensoras de la activación de linfocitos T como el IFN- γ moléculas de la cascada inflamatoria de los interferones se encuentran

aumentadas en la CIDP(204). Además de haber sido descrita la presencia de células T infiltrando el órgano diana (nervio o raíz), se han descrito niveles elevados de células T activadas circulantes en sangre periférica y un imbalance hacia fenotipos de linfocitos T CD4+ subtipo Th1 y Th17 tanto en sangre como en LCR de pacientes con CIDP en brote(205). Además las células T tienen niveles más elevados en superficie de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas lo que, junto al aumento de moléculas de adhesión y selectinas en las células endoteliales permite la entrada de los linfocitos al nervio periférico(204). Por otro lado, tanto los linfocitos T que infiltran los nervios periféricos en la CIDP como los encontrados en sangre periférica muestran un patrón oligoclonal cuando se analiza su TCR de superficie, sugiriendo que las subpoblaciones de CD8+ han proliferado tras el encuentro de un número restringido de antígenos(38, 206). Entre estos antígenos, podrían encontrarse antígenos de la mielina ya que la incubación de células mononucleares con antígenos como la proteína PMP22 de la mielina determina un aumento de la secreción de IFN- γ (207). De forma interesante, la clonalidad restringida de estos linfocitos parece desaparecer tras el tratamiento de los pacientes con IVIg(206). Además del importante papel que cumplen las células T efectoras o activadas en la patogenia de la CIDP también se han descrito alteraciones en la función de las células T reguladoras en los pacientes con CIDP(46, 47) lo cual podría contribuir a incrementar la aparición de clones de células B autoreactivas(208).

Los monocitos/macrófagos también juegan un papel crucial en la patogenia de la CIDP. Aunque son las células más frecuentes en los infiltrados inflamatorios en los pacientes con CIDP e inicialmente eran considerados

únicamente un marcador de regeneración, su función no se limita al remodelado tras una lesión(199). Contribuyen de forma fundamental a la presentación de antígenos y a la secreción de citocinas pro-inflamatorias como la IL1 β o la IL6, cuyos niveles están aumentados en el endoneuro de los nervios surales biopsiados a pacientes con CIDP(209). Sin embargo, aunque en una proporción significativa de pacientes con CIDP se encuentran infiltrados inflamatorios, estos hallazgos no son universales, lo que apunta a la posibilidad de que existan distintas variantes patogénicas dentro de la CIDP en las que el peso de la inmunidad celular o humoral difieran. La Figura 12 resume los hallazgos en la inmunopatogenia de la CIDP

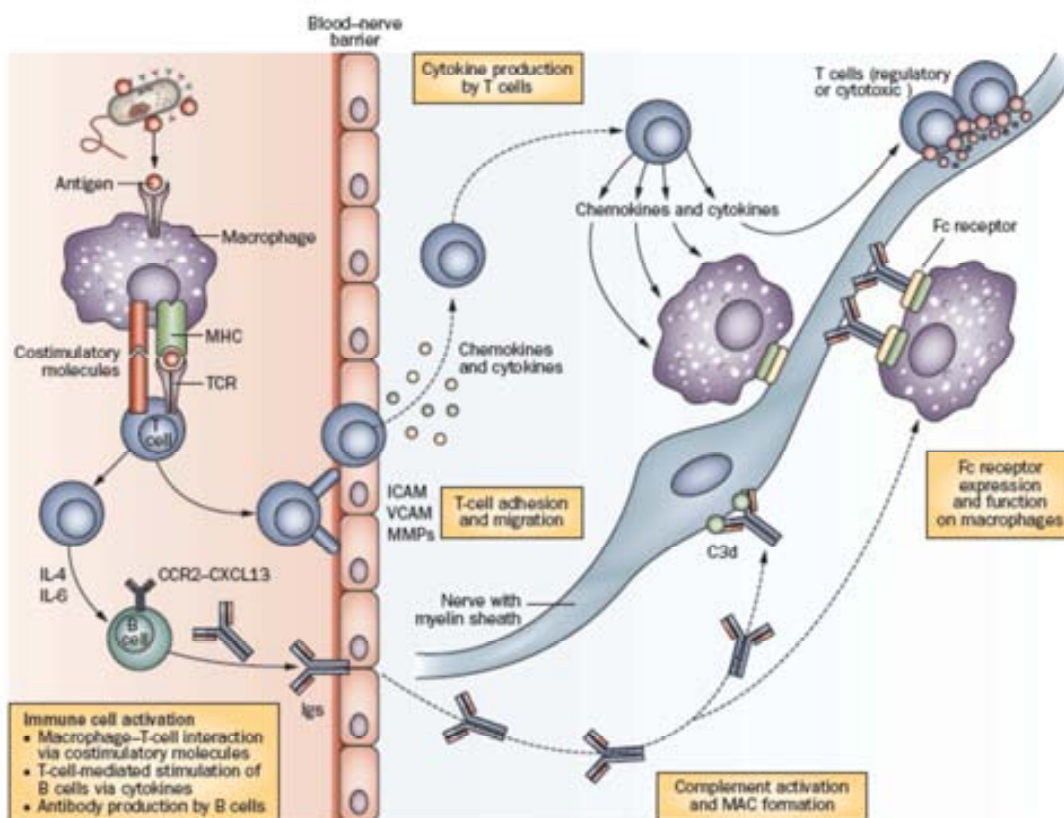


Figura 12. Representación esquemática de la patogénesis de la CIDP. La sensibilización contra un antígeno de la periferia y la consiguiente activación de las células inflamatorias determina, mediante mecanismos de mimetismo molecular la generación de anticuerpos y respuestas de células T contra el nervio periférico. Extraída de Dalakas(210).

2.2.3.2.3. *Inmunidad humoral*

La respuesta de la CIDP al tratamiento con IVIg y recambio plasmático ha sido considerada clásicamente un indicio de que la inmunidad humoral juega un papel prominente en la patogenia de la CIDP(198). Algunos datos experimentales apoyan definitivamente estos indicios: la existencia de depósitos de inmunoglobulinas y complemento en la superficie de las fibras nerviosas en las biopsias de nervio sural de pacientes con CIDP(193), los niveles disminuidos de receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas con función inhibidora (FcγRIIB) en las células B naive y la asociación de polimorfismos en dichos receptores con la CIDP(211), así como la aparición de desmielinización en nervios de rata a los que se transfirió pasivamente IgG procedente de pacientes con CIDP(212). No existen estudios respecto al fenotipo y función de las células B en la CIDP pero la búsqueda de potenciales autoanticuerpos ha sido uno de los temas de investigación principales en la CIDP. Aunque se han descrito antígenos variados, la descripción de autoanticuerpos, dada la naturaleza desmielinizante de la enfermedad, se ha centrado en proteínas de la mielina(207, 213-216). Más recientemente, el hallazgo de alteraciones en los nodos de Ranvier en las biopsias de nervio(194) y la descripción de polimorfismos en TAG-1(217), una proteína yuxtaparanodal, asociados a la respuesta a las IVIg en la CIDP han dirigido la atención al nodo de Ranvier y estructuras adyacentes como dianas de la respuesta inmune humoral.

2.2.3.2.3.1. Anticuerpos contra la mielina y gangliósidos en CIDP

La descripción de autoanticuerpos en la CIDP corre paralela al descubrimiento del potencial neuritogénico de algunas proteínas y péptidos de la mielina(218). El hecho de que tanto la fracción

mielínica de extractos proteicos de nervio como proteínas aisladas de la mielina como la P2, la PMP22 o la P0, fueran capaces de determinar la aparición de EAN en modelos animales de inmunización activa, fue clave a la hora de estudiar dichas proteínas como posibles dianas reconocidas por autoanticuerpos tanto en el SGB como en la CIDP(219, 220). Las primeras descripciones de autoanticuerpos en la CIDP datan de principios de los años 80. A pesar de que la proteína P2 había sido descrita como agente neuritogénico en los modelos animales Zweiman y colaboradores descartaron la existencia de anticuerpos contra dicha proteína en humanos(221). En la misma época Vedeler, usando la técnica de hemaglutinación mixta, describió la presencia de anticuerpos contra la mielina en pacientes con SGB y CIDP(222). Más adelante, van Doorn y colaboradores utilizaron la misma técnica para describir la presencia de anticuerpos dirigidos contra el nervio periférico en hasta el 50% de los pacientes con CIDP, aunque dichos anticuerpos estaban presentes también en una proporción significativa de pacientes con SGB y de controles(223). El descubrimiento de que la proteína PMP22 también era neuritogénica en modelos animales hizo que fuera estudiada como potencial autoantígeno en neuropatías inmunomediadas. Así, en el año 2000 el grupo de Hugues describió la presencia de anticuerpos contra PMP22 en alrededor del 30% de pacientes con CIDP(214). Casi simultáneamente y usando técnicas similares el grupo de Steck reportó una frecuencia de anticuerpos anti-PMP22 del 50% en pacientes con CIDP, pero que estaban presentes también en otras patologías, tanto autoinmunes como hereditarias(215).

Una de las proteínas, también neuritogénica, en la que más atención se ha puesto es la proteína P0 de la mielina(224). Existen casos aislados reportados de pacientes con neuropatías autoinmunes crónicas que reaccionan contra una banda en torno a los 40 KDa en experimentos con western-blotting, que fue identificada como la proteína P0 de la mielina(225). Los estudios de Yan y colaboradores, demostrando que la transferencia pasiva de IgG procedente de pacientes con CIDP determinaba desmielinización en nervios ciáticos de rata, evaluada tanto patológica como electrofisiológicamente y la posterior descripción de la proteína P0 como diana de dicha respuesta, fueron claves para considerar a la proteína P0 como un antígeno clave en la CIDP(212, 213). Sin embargo dichos estudios no fueron reproducidos por otros grupos. Se ha de señalar que la mayor parte de los primeros estudios buscando reactividades antigénicas en la CIDP estaban basados en técnicas en las que los antígenos no mantenían su estructura terciaria como western-blot o ELISA. En un trabajo de Kwa y colaboradores se estudió la existencia de anticuerpos contra P0, PMP22 y conexina-32 en pacientes con CIDP usando un sistema de expresión de proteína en células de mamífero (CHOK-1) en el que la conformación terciaria de las proteínas expresadas en membrana se asemeja más a su situación en el nervio periférico, sin que, en este caso, se observara reactividad alguna en los pacientes con CIDP(216). El mismo grupo, utilizando inmunocitoquímica sobre células de Schwann descubrió la presencia de autoanticuerpos en un 30% de pacientes con CIDP, aunque no pudieron llegar a identificar el antígeno diana específico reconocido

por los anticuerpos de dichos pacientes(226). Estudios más recientes usando péptidos de las proteínas P0, P2 y PMP22 no lograron encontrar evidencia de anticuerpos contra dichas proteínas en CIDP(207, 227), motivo por el cual su uso como potenciales biomarcadores de la enfermedad no ha prosperado.

De la misma forma que en el SGB el estudio de antígenos glucolipídicos en la CIDP ha sido otro tema importante de investigación. El grupo de van Schaik describió la presencia de anticuerpos anti-GM1 en el 20% de pacientes con CIDP(228) y el grupo de Yuki describió la presencia de anticuerpos contra SGPG de la clase IgM en un pequeño porcentaje de pacientes con CIDP(229), sin embargo estas reactividades no han sido confirmadas posteriormente. Actualmente se acepta que, en general, los pacientes con CIDP típica carecen de reactividad contra gangliósidos clásicos como los descritos en el SGB. Fredman y colaboradores describieron la presencia de anticuerpos contra LM1 y sulfátidos en más del 60% de pacientes con CIDP(230), aunque la tasa de positividad era de alrededor del 20% en controles sanos. Kuwahara y colaboradores han confirmado la presencia de anticuerpos contra LM1 en un pequeño subgrupo de pacientes con CIDP, así como las características clínicas asociadas a dicha reactividad(231, 232). La presencia de estos anticuerpos en pacientes con SGB en proporciones similares a la CIDP dificulta su uso como biomarcadores en la práctica clínica habitual.

2.2.3.2.3.2. Anticuerpos contra antígenos neuronales y del nodo de

Ranvier

La presencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos neuronales fue otro de los temas fundamentales en la investigación en las neuropatías autoinmunes. A principios de los años 90 el grupo de Connolly y Pestronk describieron la presencia de anticuerpos contra β -tubulin en un subgrupo de pacientes con CIDP(233). Más adelante, el mismo grupo publicó la asociación de dichos anticuerpos con un fenotipo lentamente progresivo de la CIDP(234). Sin embargo, 3 estudios posteriores llevados a cabo por grupos diferentes y usando técnicas diversas, desmintieron la relevancia de los anticuerpos contra β -tubulin en la CIDP(235-237).

El hallazgo en las biopsias de nervio sural de pacientes con CIDP de que la región nodal y adyacentes de las fibras mielinizadas se encuentran alteradas(194, 195) ha puesto de relieve la importancia de dichas estructuras en su patogenia y ha determinado que la búsqueda reciente de autoanticuerpos se centre en proteínas de dicha zona(197). Casi simultáneamente Lonigro y Devaux describieron que la desmielinización en la EAN comienza con la disrupción de proteínas del paranodo (neurofascin y gliomedin) y por tanto reforzaron la relevancia de estas áreas en las neuropatías inflamatorias(238). Mathey y colaboradores describieron la presencia de anticuerpos contra neurofascin en un porcentaje significativo de pacientes con neuropatías inflamatorias(239) y, más adelante, Pruss y colaboradores corroboraron estos hallazgos, primero en el SGB y posteriormente en la CIDP también(240, 241). Durante la preparación del segundo manuscrito de esta tesis Devaux y colaboradores describieron la presencia, tanto en SGB como en CIDP, de

anticuerpos contra el nodo de Ranvier y estructuras adyacentes en inmunohistoquímica de preparaciones de nervio “teased” y cuyas dianas antigénicas eran proteínas del nodo de Ranvier como gliomedin, NrCAM, neurofascin y contactin-1, aunque las frecuencias de positividad en los controles eran relativamente altas y un porcentaje significativo de dichos pacientes presentaban autoanticuerpos de isotipo IgM(242).

En definitiva, tras un periodo inicial en el que la búsqueda de autoanticuerpos estuvo centrada en proteínas de la mielina, el estudio de las alteraciones alrededor del nodo de Ranvier ha posibilitado la detección de autoanticuerpos con reactividades potencialmente relevantes desde el punto de vista patogénico como desde el punto de vista clínico.

3. HIPÓTESIS

3.1. HIPÓTESIS GENERAL

Los pacientes con neuropatías inflamatorias tienen autoanticuerpos frente a antígenos de superficie del axón o la mielina.

Las reactividades antigénicas son múltiples y frente a moléculas tan diversas como los gangliósidos o proteínas neurales.

En los pacientes con neuropatías inflamatorias el hallazgo de autoanticuerpos específicos define subgrupos con características clínicas y patogénicas similares. Los autoanticuerpos, por tanto, pueden ser utilizados como biomarcadores con utilidad diagnóstica, pronóstica y/o terapéutica.

3.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

3.2.1. REACTIVIDADES ANTIGÉNICAS EN NEUROPATÍA SENSITIVO- ATÁXICA AGUDA

Los pacientes con neuropatía atáxica aguda comparten características clínicas y una reactividad concreta de anticuerpos antigangliósido que difiere de otros subtipos de síndrome de Guillain-Barre.

3.2.2. AUTOANTICUERPOS EN CIDP

En la patogenia de la CIDP participan autoanticuerpos específicos mielínicos y axonales. Su descripción definirá subgrupos clínicos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Describir la presencia de autoanticuerpos con utilidad diagnóstica o pronóstica en las neuropatías inflamatorias

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. REACTIVIDADES ANTIGÉNICAS EN NEUROPATÍA SENSITIVO- ATÁXICA AGUDA

Describir las reactividades antigangliósido asociadas a la neuropatía atáxica aguda utilizando métodos de ELISA y cromatografía en capa fina frente a una batería de gangliósidos conocidos.

Correlacionar el fenotipo clínico asociado a dichas reactividades y las diferencias con otras neuropatías atáxicas u otras variantes del SGB.

4.2.2. AUTOANTICUERPOS EN CIDP

Investigar la presencia de autoanticuerpos específicos de CIDP mediante un método no sesgado de búsqueda de antígenos en neuronas hipocampales.

Detectar los antígenos diana y describir su frecuencia y las características clínicas asociadas.

5. RESULTADOS

5.1. ARTÍCULO I: *Clinical and serological features of acute sensory ataxic neuropathy*

with antiganglioside antibodies. Ricard Rojas-García MD PhD, Luis Querol MD, Eduard Gallardo PhD, Noemí De Luna Salvá PhD, Cándido Juárez PhD, Mercedes Garces MD, Eva Fages MD, Carlos Casasnovas MD, Isabel Illa MD PhD. J Peripher Nerv Syst. 2012 Jun;17(2):158-68. **Factor de impacto: 2.80. Segundo cuartil.**

RESEARCH REPORT

Clinical and serological features of acute sensory ataxic neuropathy with antiganglioside antibodies

Ricard Rojas-García^{1,2}, Luis Querol¹, Eduard Gallardo^{1,2}, Noemi De Luna Salva^{1,2}, Cándido Juárez³, Mercedes Garces⁴, Eva Fages⁵, Carlos Casasnovas⁶, and Isabel Illa^{1,2}

¹Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, and Laboratory of Experimental Neurology, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Neurodegeneración (CIBERNED), Barcelona; ³Department of Immunology Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; ⁴Department of Neurology, Hospital de Manises, Valencia; ⁵Department of Neurology, Hospital Santa Maria del Rosell, Cartagena; ⁶Department of Neurology, Hospital Universitari de Bellvitge, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Abstract There is as yet no consensus for considering pure acute sensory ataxic neuropathy (ASAN) as a variant of Guillain-Barré syndrome (GBS). Reactivity against gangliosides sharing disialosyl epitopes has been reported in these patients. The aim of this study was to determine the spectrum of reactivity against gangliosides in ASAN and to define the clinical pattern. From our database we identified patients with suspicion of ASAN. We defined ASAN as the presence of ataxia of peripheral origin with loss of proprioception, and areflexia, absence of ophthalmoplegia and no or minimal muscle weakness. Patients who met these criteria were retrospectively reviewed for their spectrum of reactivity against gangliosides and clinical features. We identified 12 patients fulfilling pre-defined criteria for ASAN. Reactivity against gangliosides containing disialosyl epitopes was present in seven patients. Concomitant reactivity against other gangliosides was present in 6/7 patients. All patients presented good prognosis and an antecedent illness was present in nine. Our results support the previously described clinico-immunological association between ASAN and disialosyl specificity, and widen the spectrum of reactivity against gangliosides. The acute presentation with a monophasic course, and good prognosis in all cases, together with transient immunoglobulin G antiganglioside antibodies and infectious antecedent in 7/12 patients support the inclusion of ASAN as a GBS variant.

Key words: acute sensory ataxic neuropathy, antiganglioside antibodies, disialosyl, Guillain-Barré syndrome

Introduction

Serological patterns of reactivity against gangliosides have been described in several acute peripheral neuropathies and are related to specific clinical

syndromes (Willison and Yuki, 2002). Antiganglioside antibodies have been implicated as potential pathogenic agents in these acquired neuropathies. Guillain-Barré syndrome (GBS) is diagnosed based on clinical features, particularly motor weakness and decreased or absent muscle stretch reflexes. Objective sensory loss is usually minimal. Diagnostic criteria for a pure sensory equivalent to classic GBS were proposed in 1981 (Asbury, 1981). These included a rapid onset with widespread and symmetrical distribution,

Address correspondence to: Ricard Rojas-Garcia, MD, Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel: 34-935565986; Fax: 34-935565602; E-mail: rrojas@santpau.cat

a monophasic course, cerebrospinal fluid (CSF) albuminocytological dissociation, and nerve conduction features consistent with a demyelinating process in the peripheral nervous system.

The sensory variant of GBS was well defined in a series of patients with an acute pure sensory neuropathy fulfilling the proposed criteria for it (Oh et al., 2001). The clinical picture is characterized by acute, monophasic, sensory neuropathy accompanied by reduced muscle stretch reflexes, CSF albuminocytological dissociation and nerve conduction features of demyelination. Only single case reports and small series meeting these criteria have been barely reported (Simmons and Tivakaran, 1996; Oh et al., 2001; Lee and Lee, 2006). Sensory loss is a common feature, however, only some patients presented with ataxia and a Romberg sign (Miralles et al., 1992; Oh et al., 2001).

In 1988, Dawson and colleagues described a patient who presented with sensory loss and ataxia, with total areflexia, and CSF protein elevation. Pathological studies showed a demyelinating lesion and a close relationship to GBS was suggested (Dawson et al., 1988). However, there is no consensus concerning the inclusion of a pure acute sensory ataxic neuropathy (ASAN) as a variant of GBS. Patients who present with pure sensory ataxia and areflexia and fulfill the proposed diagnostic criteria of a sensory variant of GBS are rare. Only single cases or short series of patients have been reported (Dawson et al., 1988; Miralles et al., 1992; Oh et al., 2001; Lee and Lee, 2006). However, their clinical picture is highly stereotyped and characterized by pure sensory symptoms accompanied by reduced or absent muscle stretch reflexes, ataxia and a positive Romberg sign, in the absence of muscle weakness. Electrophysiological studies may show either normal motor nerve conduction (Lee and Lee, 2006) or features consistent with the presence of a demyelinating neuropathy (Miralles et al., 1992; Oh et al., 2001).

Willison et al. were the first to describe the presence of antiganglioside antibodies in a patient who presented with an acute self-limiting pure sensory ataxia and areflexia, without ophthalmoplegia or weakness (Willison et al., 1994). Since then only a few patients with ASAN with antibodies to GD1b alone or in combination with other disialosyl-containing gangliosides have been reported (Willison et al., 1994; Pan et al., 2001; Serrano-Munuera et al., 2001; Notturmo et al., 2008). In two cases, antibodies were monospecific against GD1b (Pan et al., 2001; Notturmo et al., 2008), although GD3 was not tested, and in the other cases anti-GD1b antibodies cross-reacted with GD3, GQ1b or GT1a (Willison et al., 1994; Notturmo et al., 2008).

A clinical picture characterized by acute onset of ataxia of cerebellar type with negative Romberg sign, and without major limb weakness or ophthalmoplegia or severe loss of proprioceptive sense was first described by Richter (1962). Because of the presence of distal paresthesia, areflexia, and raised CSF protein levels, the clinical picture was proposed as a variant of GBS. The clinical picture is now widely recognized as ataxic GBS. These patients may have high titers of anti-GQ1b antibodies during the acute phase of the illness (Mori et al., 1999; Yuki et al., 2000b).

Defining the clinical features and serological pattern of reactivity against gangliosides in ASAN may help to recognize the existence of a clinico-immunological association and to give support to consider this entity as a GBS variant and clarify the nosological relationship between patients who present with acute ataxia either of cerebellar origin or peripheral origin and presumed immuno-mediated pathogenesis. To assess this possible correlation, we selected from our database cases fulfilling diagnostic criteria for ASAN and we reviewed the clinical data and pattern of reactivity against gangliosides.

Patients and Methods

Patient selection

We selected patients from our database with suspected diagnosis of ASAN whose sera were referred to our laboratory for serum antiganglioside antibody testing. This database has over 3,000 consecutive sera remitted to our laboratory from general hospitals in Spain. Patients from January 2005 to December 2010 were included. We defined ASAN by the acute onset of a clinical picture consistent with a pure sensory ataxic syndrome characterized by ataxia with diminished or absent reflexes, and loss of proprioception. Patients with ophthalmoplegia or marked muscle weakness were excluded to ensure a homogeneous clinical picture of ASAN. Medical records of patients selected from the database were retrospectively reviewed to exclude those patients who did not fulfill our pre-defined diagnostic criteria. Patients without detailed clinical information were excluded from this study. Patients with alternative diagnosis were also excluded. The clinical features and the spectrum of reactivity against gangliosides according to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and thin-layer chromatography (TLC) immunodetection of those patients who met our criteria were retrospectively reviewed.

This study was approved by the institutional ethics committee (Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo).

ELISA and TLC immunodetection

Serum samples from all patients were analyzed for immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) antibodies to GM1, GM2, GM3, asialo-GM1, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GT1a, and GQ1b by standard ELISA, as previously described (Willison et al., 1999). TLC immuno-overlay was performed as described (O'Hanlon et al., 2000). All samples were obtained and analyzed during the acute phase of the illness. Anti-GT1a antibodies were analyzed in sera from 2006 onward.

When serum reactivity against gangliosides was found, and serum sample from the acute phase was available, we performed inhibition studies in order to determine whether the disialosyl epitope recognized by the antibodies was terminal or internal. A competitive inhibition assay followed by ELISA was made as previously described (O'Hanlon et al., 2000). The sera were tested by ELISA, looking for reactivity against GD1b (with internal disialosyl group), GD3 (with terminal disialosyl group), and GQ1b (with both). Sera were incubated with GD1b, GD3, GM1, and phosphate buffered saline (PBS) before performing ELISA.

Results

Selection of patients

From our database with more than 3,000 serum samples, we detected 16 cases that were remitted for serological characterization with a clinical diagnosis of acute sensory ataxia. After reviewing medical records, 2 of these 16 patients were excluded from this study because of alternative diagnosis during follow-up. The final diagnosis was metronidazol toxicity in one patient and anti-Hu paraneoplastic neuronopathy in the other. Both patients were negative for antiganglioside antibodies. Two more patients were excluded because no clinical information was available from their medical records or referral neurologists. Isolated reactivity of the IgG class against GD1b, by ELISA, was detected in one patient, whereas the other was negative for the antiganglioside antibodies tested. Sufficient clinical information was retrieved from the remaining 12 cases and all cases fulfilled the proposed diagnostic criteria.

Clinical features of patients without antiganglioside antibodies

Only five patients with no antiganglioside antibodies had sufficient clinical data for inclusion in this study and this information is summarized in Table 1. Three of the five patients were men. Median age at onset of symptoms was 62 years, with a range of 18–74 years.

Pharyngitis developed 7 days before the onset of neurologic symptoms in patient 10, and diarrhea developed 3 weeks before the onset in patient 9. No other antecedent event was present in any of the other three patients. Distal paresthesia and gait unsteadiness were the initial symptoms in all cases. In all patients, neurological examination showed ataxia and areflexia and upper and lower limb coordination was severely affected. Proprioception and vibratory sensation was impaired in all patients except patient 3. Ptosis was not present in any of the five patients. External ocular movements were unaffected. Patients 9 and 10 displayed mild limb distal muscle weakness.

Four patients (patients 8–11) were treated with intravenous immunoglobulins (IVIg). Three of them had an early and good response and recovered completely. The remaining patient also responded favorably but mild ataxia persisted for 9 months. Patient 12 did not receive any treatment and recovered spontaneously without any residual disability.

Clinical features of patients with antiganglioside antibodies in ASAN

Seven patients with antiganglioside antibodies had sufficient clinical data for inclusion in this study and this information is summarized in Table 1. Four of the seven patients were men. Median age at onset of symptoms was 59 years, with a range of 23–73 years.

All patients developed a respiratory tract infection at some time in the 3 weeks before the onset of neurologic symptoms. Distal paresthesia, gait unsteadiness, and tingling in hands and feet were the initial symptoms in all cases. Gait unsteadiness increased rapidly and caused walking difficulties (range 2–5 days). In one patient (patient 2), symptoms were accompanied by dysphagia from the onset. In all patients, neurological examination showed that upper and lower limb coordination was severely affected. Tendon reflexes were absent and impaired joint position sense was widespread. Vibratory sensation was impaired in five patients (2–4, 6 and 7). Romberg sign was present in all patients. Five patients showed drooping of the eyelids. External ocular movements were unaffected. No patients complained of diplopia. Some degree of bulbar dysfunction was present during the acute phase in two of the seven patients, and reactivity against NeuNAc(α 2-3)Gal epitope was present in both. Patients 4 and 6 were initially oriented as GBS based on mild limb muscle weakness (Table 1). We included these patients because sensory impairment and ataxia were the predominant neurological features, and muscle weakness was minimal. Patient 5 presented with

Table 1. Clinical data.

Patient	Age at Onset, Sex	Clinical Diagnosis	Antecedent Events, Time Before Onset	Initial Neurological Symptoms	Other Neurological Signs	CSF Protein Levels (Normal <0.450 g/l); Cerebrospinal Fluid Cell Count	Treatment	Residual Disability
Patients with positive antiganglioside antibodies								
1	23, Female	ASAN	Flu-like, 1 week	Paresthesia, gait unsteadiness	Ptosis	0.280 g/l; acellular	None	None
2	35, Male	ASAN Bulbar palsy	Flu-like, 1 week	Paresthesia, gait unsteadiness, dysphagia	Ptosis Dysarthria, dysphonia Vocal cord paralysis	0.495 g/l; acellular	IVIg	Mild ataxia
3	68, Male	ASAN	Flu-like, 1 week	Paresthesia, gait unsteadiness	Ptosis	0.540 g/l; acellular	IVIg	None
4	72, Male	ASAN/GBS	Flu-like, 2 weeks	Paresthesia, gait unsteadiness	Ptosis, Dysphonia, nasal voice Mild proximal (MRC 4/5) and distal (MRC 4+/5) lower limb muscle weakness	0.600 g/l; 5 cells	IVIg	None
5	54, Male	ASAN	Flu-like 2 weeks	Paresthesia, gait unsteadiness	Later mild distal (wrist flexion and extension MRC 4/5, ankle dorsiflexion MRC 4+/5) and proximal (MRC 4/5) limb muscle weakness	0.390 g/l; 4 cells	IVIg	None
6	59, Male	ASAN/GBS	Flu-like 3 weeks	Paresthesia, gait unsteadiness	Ptosis Respiratory failure, IMV Mild proximal lower limb muscle weakness (MRC 5-/5) Difficulties to stand up from the sitting position	ND	IVIg	None
7	73, Male	ASAN	Flu-like 3 weeks	Paresthesia, gait unsteadiness		0.450 g/l; acellular	IVIg	None
Patients with negative antiganglioside antibodies								
8	74, Male	ASAN	None	Paresthesia		0.108 g/l; acellular	IVIg	None
9	70, Female	ASAN	Diarrhea, 3 weeks	Paresthesia	Distal muscle weakness in lower limbs	0.370 g/l; 1 cell	IVIg	None
10	18, Female	ASAN	Pharyngitis, 1 week	Paresthesia, gait unsteadiness	Mild distal weakness 4/5	0.550 g/l; 1 cell	IVIg	None
11	62, Male	ASAN	None	Paresthesia, gait unsteadiness		Traumatic	IVIg	Mild ataxia
12	57, Male	ASAN	None	Gait unsteadiness		ND	None	None

Flu-like refers to a respiratory tract infection.

ASAN, acute sensory ataxic neuropathy; CSF, cerebrospinal fluid; GBS, Guillain-Barré syndrome; IVIg, intravenous immunoglobulin; IMV, invasive mechanical ventilation; ND, not done.

Table 2. Serological data.

Patient	Clinical Diagnosis	Gangliosides Recognized by ELISA	Gangliosides Recognized by Thin-Layer Chromatography	Specificity	Ig Class
1	ASAN	GD1b GM3	GD1b, GD3, GQ1b GM3	Disialosyl	IgG
2	ASAN	GQ1b, GD3, GT1a, GT1b GM3, GD1a	Not done	Disialosyl NeuNAcGal	IgG
3	ASAN	GD1b, GQ1b, GD3, GT1a, GT1b GM3	GD1b, GD3, GQ1b, GT1a, GT1b GM3	Disialosyl	IgG
4	ASAN/GBS	GD1b, GD3, GQ1b, GT1b, GT1a GM3, GD1a	GD1b, GD3, GQ1b, GT1b, GT1a GM3, GD1a	Disialosyl NeuNAcGal	IgG
5	ASAN	GD1b	GD1b, GT1a GM1 (asialo-GM1)	Disialosyl (GalGalNAc)	IgG
6*	ASAN/GBS	GD3, GQ1b, GT1b	GD3, GQ1b, GT1a, GT1b GM3	Disialosyl	IgG
7*	ASAN	GD1b, GQ1b, GD3, GT1b GM1, GD1a	Not done	Disialosyl	IgG

In bold gangliosides containing terminal or internal disialosyl epitopes.

ASAN, acute sensory ataxic neuropathy; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GBS, Guillain-Barré syndrome.

*GT1a was not tested by ELISA during the acute phase of the illness.

a pure sensory syndrome. He later developed mild muscle weakness but recovered completely.

Six patients (patients 2–7) were treated with intravenous immunoglobulins. Five of them had a good response and recovered completely. The patient that was not treated also responded favorably but mild ataxia persisted for 9 months. Patient 1 did not receive any treatment and recovered spontaneously without any residual disability.

Pattern of reactivity against gangliosides

No antiganglioside reactivity was detected in the sera of 5 of the 12 patients included in this study. The remaining seven cases showed IgG antiganglioside reactivity against one or more of the gangliosides tested. All seven patients displayed reactivity against gangliosides sharing the disialosyl terminal epitope. In five of the seven, the sera recognized three or more of the five disialosyl-containing gangliosides tested (GD1b, GD3, GT1b, GT1a, and GQ1b) by ELISA (Table 2). In case 1, the sera recognized only one of these gangliosides, GD1b. However, TLC showed reactivity against GD3 and GQ1b gangliosides, which was not detected by ELISA, in addition to reactivity against GD1b. In case 5, isolated reactivity against GD1b was detected by ELISA. However, TLC showed reactivity against GT1a and GM1 gangliosides, which was not detected by ELISA, and confirmed reactivity against GD1b.

Isolated reactivity against disialylated gangliosides, by ELISA, was present in two cases (patients 5 and 6). In the remaining five cases, the sera also reacted with gangliosides that do not bear disialosyl groups. The most frequent additional reactivity was against

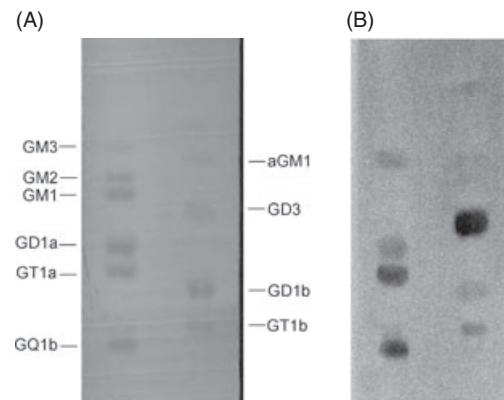


Figure 1. The left panel (A) shows resorcinol sprayed ganglioside standards. The right panel is a representative Thin Layer Chromatography (TLC) overlay of gangliosides immunostained with sera from patient 4 (B). TLC confirmed reactivity against GD1b, GD3, GQ1b, GT1a, GT1b, GD1a and GM3 that were also detected by ELISA. The whole results suggest a reactivity against NeuNAc(α 2-3)Gal in addition to reactivity against disialosyl epitope. aGM1 is asialo-GM1.

GM3 in patients 1–4. In two of them, cases 2 and 4, that have been reported elsewhere (Rojas-García et al., 2010), ELISA identified simultaneous reactivity against GM3, GT1b, and GD1a gangliosides, suggesting binding specificity for terminal NeuNAc(α 2-3)Gal cross-reactivity (Fig. 1). In patient 6, TLC immunodetection confirmed the results obtained by ELISA and additional reactivity against GM3 was detected (Fig. 2). In case 7, ELISA demonstrated IgG reactivity against GM1 and GD1a in addition to antibodies against gangliosides with disialosyl epitope.

Antiganglioside antibodies were of the IgG class in all patients. All samples were collected and analyzed

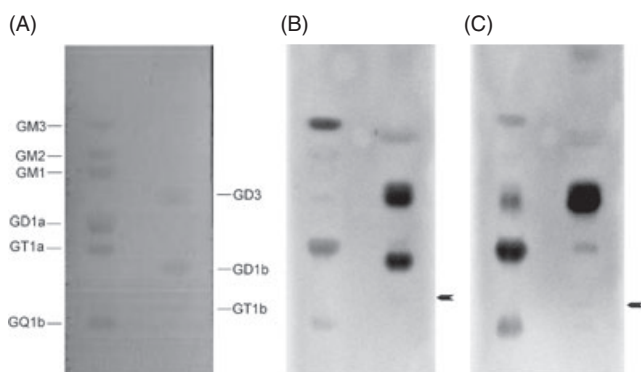


Figure 2. The left panel (A) shows resorcinol sprayed ganglioside standards. The right panel is a representative thin layer chromatography (TLC) overlay of gangliosides immunostained with sera from patients 3 (B) and 6 (C) at 1:100 dilution showed the spectrum of ganglioside reactivity. In B, TLC confirmed the reactivity against GM3 and against disialosyl epitope, shared by GD1b, GD3, GQ1b, GT1b (arrowheads) and GT1a. In case C, TLC confirmed reactivity against GD3, GT1b (arrowheads) and GQ1b that were also detected by ELISA and revealed additional reactivity against GM3 and GT1a gangliosides.

during the acute phase of the illness. A serum sample was also collected after clinical recovery in five of seven patients (cases 1–5) (Table 3) and ELISA was negative for all tested antiganglioside antibodies in all five cases.

Serum samples obtained during the acute phase were available from patients 3 to 4. Inhibition studies showed reactivity against the three gangliosides used (GD3, GD1b, and GQ1b), which was not inhibited after incubation with GM1 and PBS, but reactivity against the three disialylated gangliosides was inhibited after incubation with either GD1b or GD3. Data obtained

from these two sera suggest that a single antibody recognizes the disialosyl groups both terminal and internal.

Electrophysiological studies in patients with antiganglioside antibodies

Conduction studies were available for five of the seven patients with antiganglioside antibodies. Sensory and motor nerve conduction studies were normal in three of them (patients 1, 2 and 7). Tibial H-reflex was absent during the acute phase in patient 1 and reappeared after 3 months. Sensory nerve conduction studies showed reduced sensory nerve action potential (SNAP) amplitudes in patient 3, whereas motor nerve conduction studies showed normal values. SNAP were absent in patient 6 along with reduced compound muscle action potential amplitudes, slightly prolonged distal motor latencies (DML), and reduced conduction velocities in motor conduction studies. Electrophysiological studies showed partial restoration of SNAP amplitudes after 1 month (Tables 4 and 5).

Detailed conduction studies were not available from patients 4 to 5.

Electrophysiological studies in patients without antiganglioside antibodies

Electrophysiological studies were not available from patient 11. Sensory nerve conduction studies were normal in patients 9 and 10, showed reduced SNAP amplitudes in patient 8 and no SNAPs were obtained in patient 12. Motor nerve conduction studies showed normal values in the four patients, except by a slightly prolonged DML in patient 9 (Tables 4 and 5).

Table 3. Serial antiganglioside antibody titers.

Patient	DAO	Ig Class	Gangliosides Recognized by ELISA and Sequential Titers								
			GM1	GM2	GM3	GD1a	GT1b	GD1b	GD3	GQ1b	GT1a
1	3	IgG	—	—	2000	—	—	12,500	—	—	—
	30		—	—	900	—	—	1800	—	—	—
	410		—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	4	IgG	—	—	1400	4000	2400	—	9000	10,000	2000
	95		—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	5	IgG	—	—	5000	—	2500	12,500	10,000	6000	7000
	120		—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	7	IgG	—	—	2000	820	2300	600	2050	2300	3500
	55		—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	1	IgG	—	—	—	—	—	9500	—	—	—
	96		—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	7	IgG	—	—	—	—	1200	—	1150	2400	ND
	7		—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	6	IgM	13,000	—	—	2300	15,000	2200	15,000	2300	ND
	6		1800	—	—	—	—	1500	—	—	ND

DAO, days after onset; ND, not done.

Table 4. Electrophysiological studies, sensory conduction studies.

Patient Number/Nerve	Sensory Conduction Studies			Normal Values	Conduction Velocity, m/s		Normal Values
	Amplitude, μ V (Days After Onset) Values				Values		
Patient 1	(5)	(150)					
Radial, left	21	ND		>14	63	ND	>51
Sural, right/left	ND/27	35/34		>5	53	50/61	>38
Patient 2	(10)	(120)	(330)				
Median, right/left	21/18	8.2	9.4/7.3	>16	36.1/33.3	37.9	>44
Radial, right	12	9.6		>14	55.9	41.8	>51
Sural, right/left	5.5/5.5			>5	36.5/33.9	45.1/47.5	>38
Patient 3	(8)						
Radial	1.2			>14	60.6		>51
Peroneal	2.7			>6	43.8		>39
Sural	2.8			>5	44.6		>38
Patient 6	(13)	(68)					
Median, left	NR	9.7		>16	NA	34.1	>44
Ulnar, right	NR	5.1		>15	NA	40	>15
Sural, right and left	NR	NR/1.8		>5	NA	NA/40.7	>38
Patient 7	(5)	(14)					
Median, right	19	18		>16	54.8	47.2	>44
Ulnar, left	12.5	7.5		>15	42.3	38.8	>15
Sural, right/left	9.6/9.7	7.3/7.8		>5	39.5/38	41.2/47.2	>38
Patient 8	(7)						
Radial, right	7			>14	52.1		>51
Sural, right/left	4.5/4.2			>5	50.9/54.5		>38
Patient 9	(6)						
Radial, right	16.3			>14	64.7		>51
Superficial peroneal, left	23.8			>6	65		>39
Sural, right/left	46.2/46			>5	50.5/56.7		>38
Patient 10	(10)						
Sural, right/left	7.7/6.6			>5	49.7/53.3		>38
Patient 12	(8)						
Ulnar, right/left	NR			>15	NA		>15
Radial, right/left	NR			>14	NA		>51
Sural, right/left	NR			>5	NA		>38

NA, not applicable; ND, not done; NR, no response.

Discussion

We report the whole pattern of reactivity against gangliosides in a series of patients sharing a highly homogeneous clinical picture, characterized by ataxia, Romberg's sign, areflexia, and proprioceptive sensory impairment, consistent with the peripheral origin of the ataxia. Although electrophysiological studies did not demonstrate a demyelinating process, the acute onset and rapidly progressive clinical presentation, the monophasic course recovery, and the infectious antecedent strongly suggest an immuno-mediated pathogenesis and support the inclusion of this syndrome as a variant of GBS.

Previous data have established an association between ASAN and reactivity against gangliosides restricted to those with disialosyl groups. This reactivity has been related to a well-defined clinical picture of acute (Yuki et al., 1992; Willison et al., 1994; Pan et al., 2001; Serrano-Munuera et al., 2001; Notturmo et al., 2008; Rojas-García et al., 2008b) and

chronic sensory ataxic neuropathy (Ilyas et al., 1985; Daune et al., 1992; Brindel et al., 1994; Willison et al., 2001; Rojas-García et al., 2010). Our present data widen the spectrum of reactivity in ASAN. In addition to antidisialosyl antibodies, we frequently found reactivity against gangliosides, such as GD1a and GM3, that lack disialosyl epitopes and share a NeuNAc(α 2-3)Gal terminal epitope. This terminal epitope is present in GT1b, which also contains a disialosyl group (Rojas-García et al., 2006; 2008b; 2010). Reactivity against GM3 but not against GD1a was detected in two other patients, suggesting a partial cross-reactivity against the epitope NeuNAc(α 2-3)Gal. This spectrum of reactivity has been reported in a patient with acute relapsing sensory ataxic neuropathy (Rojas-García et al., 2008b), acute sensory ataxic neuropathy (Rojas-García et al., 2010), and chronic sensory ataxic neuropathy with antidisialosyl antibodies (Willison et al., 2001; Rojas-García et al., 2010). All these data suggest that in some cases ataxia could be related to a wider spectrum of reactivity and not limited to

Table 5. Electrophysiological studies, motor conduction studies.

Motor conduction studies									
Patient Number/ Nerve	Distal Motor Latency, ms (Days After Onset) Values		Normal Values	Amplitude, mV (Days After Onset) Values		Normal Values	Conduction Velocity, m/s (Days After Onset) Values		Normal Values
Patient 1	(5)								
Median, left	3.0		<3.9	12.5		>6	66		>50
Peroneal, right/left	3.8/4.3		<5	11.5/11.6		>2	54/51		>42
Patient 2	(10) (120)								
Median, right/left	3.6/3.9 3.7/ND		<3.9	7.8/9 10.7/ND		>6	49.4/48.3 54.2/ND		>50
Ulnar, right	2.4		<3.3	8.5		>5	58.5		>48
Peroneal, right/left	3.7/3.2 3.35/ND		<5	6.8/7.8 14/ND		>2	47.1/49.3 45.7/ND		>42
Patient 3	(8)								
Ulnar, right	3.2		<3.3	12.1		>5	52.9		>48
Peroneal, right	3.8		<5	2.9		>2	47.7		>42
Tibial, left	4.1		<6	9.7		>3	46.7		>38
Patient 6	(13) (68)								
Median, right	4.85 4.35		<3.9	6.5 11.2		>6	48.9 51		>50
Ulnar, right/left	3.8/3.7 2.7/ND		<3.3	3.5/2.2 4/ND		>5	46.9/44.4 57.1/ND		>48
Peroneal, left	3.95 4.8		<5	1.8 1.9		>2	44.7 44		>42
Patient 7	(5) (14)								
Median, right	3.3		<3.9	8.1		>6	51.1		>50
Ulnar, right	2.95		<3.3	7.5		>5	59.5		>48
Peroneal, left	4.75 5.45		<5	5.9 4.0		>2	43.2 37		>42
Patient 8	(7)								
Ulnar, right	2.4		<3.3	11		>5	65		>48
Peroneal, right/left	4/4.1		<5	5.9/5.8		>2	52.1/53.9		>42
Patient 9	(6)								
Median, left	5		<3.9	7		>6	50.6		>50
Peroneal, right	3.8		<5	4.2		>2	56		>42
Patient 10	(10)								
Median, right	2.85		<3.9	22		>6	68		>50
Peroneal, right/left	4.9/3.8		<5	5.8/9		>2	49.9/42		>42
Patient 12	(8)								
Median, left	3.8		<3.9	11.7		>6	52.8		>50
Ulnar, left	3.15		<3.3	10.2		>5	63		>48
Peroneal, left and right	3.8/4.5		<5	8.8/8.6		>2	41.5/43.6		>42

NR, No response; ND, not done; NA not applicable.

GD1b or other disialylated structures. Data obtained from inhibition studies suggest that a single antibody recognizes the disialosyl groups both terminal and internal. However, no strong conclusions can be drawn from only two sera analyzed.

The central or peripheral nerve origin for ataxia in GBS and its variants is an issue of considerable debate. Some case series have reported patients who have ataxia as the dominant clinical feature but no limb weakness or proprioceptive impairment. The terms ataxic GBS, sensory ataxic GBS, and pure sensory GBS are used indistinctly when ataxia is the main clinical feature. Furthermore, the nosology of ataxic syndromes is blurred by the presence of reactivity against GQ1b alone or in cross-reactivity with GT1a, or GD1b and other gangliosides containing disialosyl groups (Kusunoki et al., 1999; Mori et al., 1999; Yuki et al., 2000a; 2000b).

A clinical picture characterized by cerebellar-type ataxia without major limb weakness, ophthalmoplegia,

or severe loss of proprioceptive sense was first described by Richter (1962) and was proposed as a variant of GBS. Occasional similar patients displaying high titers of anti-GQ1b antibodies during the acute phase of the illness have been reported (Mori et al., 1999). Two studies have described patients with a clinical picture characterized by the presence of acute ataxia and areflexia but without ophthalmoplegia or significant sensory loss. The patients did not have significant limb weakness and clinical features were consistent with the ataxic form of GBS (Kusunoki et al., 1999; Yuki et al., 2000b). These patients had anti-GQ1b antibodies, which cross-reacted with GT1a, and did not react with GD1b. These patients, therefore, had specificities that were indistinguishable from those in the patients with Miller-Fisher syndrome (MFS). A clinically and immunologically continuous spectrum including acute ataxia, MFS, and ataxic GBS has been proposed.

Data supporting a peripheral origin of the ataxia in GBS focus on reactivity against GD1b and disialylated

structures. Reactivity against GD1b has been related to sensory ataxia in a few acute (Willison et al., 1994; Pan et al., 2001; Serrano-Munuera et al., 2001; Notturmo et al., 2008), acute relapsing (Yuki et al., 1992; Rojas-García et al., 2008b), and chronic cases (Ilyas et al., 1985; Daune et al., 1992; Brindel et al., 1994; Willison et al., 2001). This clinico-immunological association is supported by the presence of GD1b in the dorsal root ganglia neurons (Kusunoki et al., 1993) and by induction of experimental sensory ataxic neuropathy in rabbits sensitized with GD1b (Kusunoki et al., 1996). Moreover, available detailed electrophysiological data from previously reported patients with ASAN and antiganglioside antibodies suggest the involvement of sensory fibers or primary sensory neurons in dorsal root ganglia (Willison et al., 1994; Pan et al., 2001; Notturmo et al., 2008). This conclusion was drawn because electrophysiological studies showed absence or markedly diminished amplitude of SNAPs. However, the complete and quite rapid, clinical and electrophysiological recovery is incompatible with primary sensory neuron or axonal damage (Pan et al., 2001; Notturmo et al., 2008). An immuno-mediated demyelinating lesion or reversible conduction block was proposed as a pathophysiological mechanism of these neuropathies (Notturmo et al., 2008). However, the most frequent electrophysiological pattern in our patients was normal sensory and motor conduction studies pointing to pre-ganglionic dorsal roots as the site of the lesion (Chin et al., 2004; Sinnreich et al., 2004; Notturmo et al., 2008). Sensory nerve conduction studies may be normal in a very small number of patients, presenting with pure or pre-dominant sensory ataxia. A demyelinating lesion of proximal segments in dorsal nerve roots has been suggested as the cause in these cases (Cros, 1992; Citak et al., 1993; Chin et al., 2004; Rojas-García et al., 2008a). In one series of patients who were clinically characterized by chronic sensory ataxia and normal sensory nerve conduction studies, the authors suggested localized demyelinating involvement of sensory roots proximal to the dorsal root ganglia (Sinnreich et al., 2004). This is supported by enlargement of lumbar nerve roots with enhancement after contrast administration revealed by magnetic resonance imaging (MRI) in three patients of the series (Sinnreich et al., 2004). Furthermore, gadolinium enhancement of the posterior roots was reported in an ASAN patient suggesting posterior roots as the site of the pathologic process (Wada et al., 1997). Similar to the patients reported by Sinnreich et al., the electrophysiological pattern of absent H-reflex and normal SNAP, in the presence of sensory ataxia in one of our patients, suggests the proximal segments of sensory roots as the site of the lesion. This is reinforced by the reappearance of H-reflex after

clinical improvement in our patient. Moreover, H-reflex was absent also in patients 9 and 10 along with normal sensory conduction studies, however, no subsequent studies were available from these patients. Similarly, bilateral absence of tibial H-reflexes was the major finding on initial examination in two patients with ASAN reported by Pan et al. (2001).

A recent study reported the findings of antiganglioside antibodies testing in patients with acute ataxia without ophthalmoplegia (Ito et al., 2011). Patients were divided into two different groups depending on the presence or absence of Romberg's sign. Almost one-third of them presented with a positive Romberg's sign and sensory disturbance. Clinical features of these two groups were remarkably similar with respect to rate of preceding infections, sensory symptoms, areflexia, and CSF albuminocytological dissociation. The only difference between the two groups was the significantly higher frequency of anti-GQ1b antibodies in patients with acute ataxia and negative Romberg sign than in patients with positive Romberg sign. However, this latest group frequently presented reactivity against GD1b alone or in combination with GQ1b. The authors concluded that ataxic GBS and ASAN form a continuous spectrum of diseases with a common etiological basis; nevertheless only these two gangliosides were tested in this study. Our study, however, suggests that a wider spectrum of reactivity can be found in patients with ASAN with positive Romberg's sign. This condition may be related to a wider spectrum of reactivity against gangliosides. The antiganglioside antibodies profile then may be a good tool to clarify the nosology of patients presenting with acute ataxia. We suggest using the term ASAN only in patients with acute ataxia and areflexia with Romberg's sign and sensory disturbance.

Conclusions of the study can be conditioned by limited availability and accuracy of the clinical data, derived from the retrospective nature of this study. Furthermore, we collect samples from all over Spain but we cannot guarantee a complete ascertainment of all incident cases in the catchment area. Then, the results of this study could be only considered as descriptive and no statistical inference of frequencies can be made. No firm conclusions can be performed when patients with or without antiganglioside antibodies are compared.

In conclusion, our study gives support to the previously suggested association of reactivity against gangliosides sharing disialosyl groups and a clinical presentation characterized by ataxia of peripheral origin in patients presenting with acute ataxia. Our data widen the spectrum of reactivity against gangliosides. The constant antecedent of flu-like illness, acute presentation with a monophasic course, and complete or nearly complete recovery and the association with

transient IgG antiganglioside antibodies supports the inclusion of ASAN as a GBS variant.

Acknowledgements

We would like to thank Carolyn Newey for editorial support. We thank Esther Ortiz and Miquel Navas for their assistance with the ELISAs and TLC immunostaining. Pablo Davila-Gonzalez, Ramon Villaverde, Yolanda Morgado, and Carmen Paradas for sending samples and collect data. This work was supported by research grant FIS PS09/01964 from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto Carlos III, Spanish Ministry of Health.

References

- Asbury AK (1981). Diagnostic considerations in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 9 (Suppl):1–5.
- Brindel I, Preud'homme JL, Vallat JM, Vincent D, Vasquez JL, Jauberteau MO (1994). Monoclonal IgM reactive with several gangliosides in a chronic relapsing polyneuropathy. *Neurosci Lett* 181:103–106.
- Chin RL, Latov N, Sander HW, Hays AP, Croul SE, Magda P, Brannagan TH 3rd (2004). Sensory CIDP presenting as cryptogenic sensory polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 9:132–137.
- Citak KA, Dickoff DJ, Simpson DM (1993). Progressive sensory radiculopathy responsive to corticosteroid therapy. *Muscle Nerve* 16:679–680.
- Cros DCK, Patel S, Gominak S (1992). Acquired pure sensory demyelinating polyneuropathy: a chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy variant? *Ann Neurol* 32:280.
- Daune GC, Farrer RG, Dalakas MC, Quarles RH (1992). Sensory neuropathy associated with monoclonal immunoglobulin M to GD1b ganglioside. *Ann Neurol* 31:683–685.
- Dawson DM, Samuels MA, Morris J (1988). Sensory form of acute polyneuritis. *Neurology* 38:1728–1731.
- Ilyas AA, Quarles RH, Dalakas MC, Fishman PH, Brady RO (1985). Monoclonal IgM in a patient with paraproteinemic polyneuropathy binds to gangliosides containing disialosyl groups. *Ann Neurol* 18:655–659.
- Ito M, Matsuno K, Sakumoto Y, Hirata K, Yuki N (2011). Ataxic Guillain-Barre syndrome and acute sensory ataxic neuropathy form a continuous spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82:294–299.
- Kusunoki S, Chiba A, Tai T, Kanazawa I (1993). Localization of GM1 and GD1b antigens in the human peripheral nervous system. *Muscle Nerve* 16:752–756.
- Kusunoki S, Shimizu J, Chiba A, Ugawa Y, Hitoshi S, Kanazawa I (1996). Experimental sensory neuropathy induced by sensitization with ganglioside GD1b. *Ann Neurol* 39:424–431.
- Kusunoki S, Chiba A, Kanazawa I (1999). Anti-GQ1b IgG antibody is associated with ataxia as well as ophthalmoplegia. *Muscle Nerve* 22:1071–1074.
- Lee SS, Lee SH (2006). Does sensory Guillain-Barre syndrome exist without any abnormalities in motor nerve conduction? *Neurology* 66:947–948.
- Miralles F, Montero J, Rene R, Martinez Matos JA (1992). Pure sensory Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:411–412.
- Mori M, Kuwabara S, Koga M, Asahina M, Ogawara K, Hattori T, Yuki N (1999). IgG anti-GQ1b positive acute ataxia without ophthalmoplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67:668–670.
- Notturmo F, Caporale CM, Uncini A (2008). Acute sensory ataxic neuropathy with antibodies to GD1b and GQ1b gangliosides and prompt recovery. *Muscle Nerve* 37:265–268.
- O'Hanlon GM, Veitch J, Gallardo E, Illa I, Chancellor AM, Willison HJ (2000). Peripheral neuropathy associated with anti-GM2 ganglioside antibodies: clinical and immunopathological studies. *Autoimmunity* 32:133–144.
- Oh SJ, LaGanke C, Claussen GC (2001). Sensory Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 56:82–86.
- Pan CL, Yuki N, Koga M, Chiang MC, Hsieh ST (2001). Acute sensory ataxic neuropathy associated with monospecific anti-GD1b IgG antibody. *Neurology* 57:1316–1318.
- Richter RB (1962). The ataxic form of polyradiculoneuritis (Landry-Guillain-Barre syndrome). Clinical and pathologic observations. *J Neuropathol Exp Neurol* 21:171–184.
- Rojas-García R, Martínez-Lage M, Gallardo E, de Luna N, Marti-Vilalta JL, Diaz-Manera J, Juárez C, Blesa R, Illa I (2006). A novel antiganglioside specificity against terminal NeuNAc(α2-3)Gal in acute bulbar palsy. *J Neuroimmunol* 176:219–222.
- Rojas-García R, Gallardo E, De La Torre C, Sanvito L, Illa I (2008a). Chronic sensorimotor polyradiculopathy with antibodies to P2: an electrophysiological and immunoproteomic analysis. *Muscle Nerve* 38:933–938.
- Rojas-García R, Gallardo E, Povedano M, de Luna N, Bruna J, Juárez C, Diaz-Manera J, Martínez-Matos JA, Illa I (2008b). Antibodies against disialosyl and terminal NeuNAc(α2-3)Gal ganglioside epitopes in acute relapsing sensory ataxic neuropathy. *J Neurol* 255:764–766.
- Rojas-García R, Gallardo E, De Luna N, Juárez C, Martínez-Hernández E, Carvajal A, Casasnovas C, Fages E, Davila-Gonzalez P, Illa I (2010). Bulbar involvement in patients with antiganglioside antibodies against NeuNAc(α2-3)Gal. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:623–628.
- Serrano-Munuera C, Gallardo E, Rojas R, De Luna N, Gonzalez-Masegosa A, Marti-Masso JF, Martínez-Matos A, Ortiz N, Rene R, Berciano J, Grau JM, Willison HJ, Graus F, Illa I (2001). Antiganglioside antibodies in acute self-limiting ataxic neuropathy: incidence and significance. *J Neuroimmunol* 120:78–83.
- Simmons Z, Tivakaran S (1996). Acquired demyelinating polyneuropathy presenting as a pure clinical sensory syndrome. *Muscle Nerve* 19:1174–1176.
- Sinnreich M, Klein CJ, Daube JR, Engelstad J, Spinner RJ, Dyck PJ (2004). Chronic immune sensory polyradiculopathy: a possibly treatable sensory ataxia. *Neurology* 63:1662–1669.
- Wada M, Kato T, Yuki N, Hosoya T, Moriai S, Kurita K, Yamaguchi K, Sasaki H (1997). Gadolinium-enhancement of the spinal posterior roots in acute sensory ataxic neuropathy. *Neurology* 49:1470–1471.
- Willison HJ, Almemar A, Veitch J, Thrush D (1994). Acute ataxic neuropathy with cross-reactive antibodies to GD1b and GD3 gangliosides. *Neurology* 44:2395–2397.
- Willison HJ, Veitch J, Swan AV, Baumann N, Comi G, Gregson NA, Illa I, Zielasek J, Hughes RA (1999). Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum antiganglioside antibodies. *Eur J Neurol* 6:71–77.

- Willison HJ, O'Leary CP, Veitch J, Blumhardt LD, Busby M, Donaghy M, Fuhr P, Ford H, Hahn A, Renaud S, Katifi HA, Ponsford S, Reuber M, Steck A, Sutton I, Schady W, Thomas PK, Thompson AJ, Vallat JM, Winer J (2001). The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 124:1968–1977.
- Willison HJ, Yuki N (2002). Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 125:2591–2625.
- Yuki N, Miyatani N, Sato S, Hirabayashi Y, Yamazaki M, Yoshimura N, Hayashi Y, Miyatake T (1992). Acute relapsing sensory neuropathy associated with IgM antibody against B-series gangliosides containing a GalNAc beta 1-4(Gal3-2 alpha NeuAc8-2 alpha NeuAc)beta 1 configuration. *Neurology* 42:686–689.
- Yuki N, Susuki K, Hirata K (2000a). Ataxic form of Guillain-Barré syndrome associated with anti-GD1b IgG antibody. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69:136–137.
- Yuki N, Susuki K, Hirata K (2000b). Ataxic Guillain-Barre syndrome with anti-GQ1b antibody: relation to Miller Fisher syndrome. *Neurology* 54:1851–1853.

5.2. **ARTÍCULO II: Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating**

polyneuropathy. Luis Querol MD, Gisela Nogales-Gadea PhD, Ricard Rojas-Garcia MD

PhD, Eugenia Martinez-Hernandez MD, Jordi Diaz-Manera MD, Xavier Suarez-Calvet

MSc, Miquel Navas, Josefa Araque RPN, Eduard Gallardo PhD and Isabel Illa MD PhD.

Ann Neurol. 2013 Mar;73(3):370-80. **Factor de Impacto: 11.09. Primer decil.**

Antibodies to Contactin-1 in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy

Luis Querol, MD,^{1,2} Gisela Nogales-Gadea, PhD,^{1,2} Ricard Rojas-Garcia, MD, PhD,^{1,2}
 Eugenia Martinez-Hernandez, MD,^{1,2} Jordi Diaz-Manera, MD,^{1,2}
 Xavier Suárez-Calvet, MSc,^{1,2} Miquel Navas,^{1,2} Josefa Araque, RPN,^{1,2}
 Eduard Gallardo, PhD,^{1,2} and Isabel Illa, MD, PhD^{1,2}

Objective: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is a frequent autoimmune neuropathy with a heterogeneous clinical spectrum. Clinical and experimental evidence suggests that autoantibodies may be involved in its pathogenesis, but the target antigens are unknown. Axoglial junction proteins have been proposed as candidate antigens. We examined the reactivity of CIDP patients' sera against neuronal antigens and used immunoprecipitation for antigen unraveling.

Methods: Primary cultures of hippocampal neurons were used to select patients' sera that showed robust reactivity with the cell surface of neurons. The identity of the antigens was established by immunoprecipitation and mass spectrometry, and subsequently confirmed with cell-based assays, immunohistochemistry with teased rat sciatic nerve, and immunoabsorption experiments.

Results: Four of 46 sera from patients with CIDP reacted strongly against hippocampal neurons (8.6%) and paranodal structures on peripheral nerve. Two patients' sera precipitated contactin-1 (CNTN1), and 1 precipitated both CNTN1 and contactin-associated protein 1 (CASPR1). Reactivity against CNTN1 was confirmed in 2 cases, whereas the third reacted only when CNTN1 and CASPR1 were cotransfected. No other CIDP patient or any of the 104 controls with other neurological diseases tested positive. All 3 patients shared common clinical features, including advanced age, predominantly motor involvement, aggressive symptom onset, early axonal involvement, and poor response to intravenous immunoglobulin.

Interpretation: Antibodies against the CNTN1/CASPR1 complex occur in a subset of patients with CIDP who share common clinical features. The finding of this biomarker may help to explain the symptoms of these patients and the heterogeneous response to therapy in CIDP.

ANN NEUROL 2013;73:370–380

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is the most frequent chronic inflammatory neuropathy. It causes predominantly proximal limb weakness, distal sensory disturbances, and areflexia.¹ The pathophysiology of this disorder remains largely unknown, although immune-mediated mechanisms have been postulated.² Diagnosis relies on clinical and electrophysiological criteria, but the term CIDP includes a remarkably heterogeneous group of phenotypes with different clinical courses, atypical variants, and

variable presence of monoclonal gammopathy.³ The discovery of biomarkers could help to define subgroups with common clinical features, pathogenic mechanisms, or response to therapy.⁴

Several immune mechanisms have been implicated in CIDP involving both cellular and humoral immunity.² The response to intravenous immunoglobulin (IVIg) and plasma exchange (PEX) support a role for humoral factors and, among them, autoantibodies.⁵ Further evidence is provided by the presence of immunoglobulin G (IgG)

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.23794

Received Jun 27, 2012, and in revised form Sep 15, 2012. Accepted for publication Sep 24, 2012.

Address correspondence to Dr Illa Sendra, Neuromuscular Diseases Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: iilla@santpau.cat

From the ¹Neuromuscular Diseases Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; ²Centro Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain.

Additional supporting information can be found in the online version of this article.

and complement deposition in sural nerve biopsies.⁶ In addition, passive transfer of patients' IgG to rat sciatic nerve results in demyelination.⁷ Finally, levels of the immunoglobulin Fc gamma receptor IIB are decreased in naive B cells of CIDP patients, and polymorphisms in its promoter are associated with CIDP.⁸ Considering the demyelinating nature of CIDP, myelin antigens have been the most extensively studied. Antibodies against Schwann cells in culture⁹ and several myelin proteins, including myelin protein zero,^{10–14} myelin protein 2,^{10,14–16} and myelin protein 22,^{11,16,17} have been described.

Recently, attention has been directed to axoglial junction proteins as candidate antigens for CIDP¹⁸ and other inflammatory neuropathies, such as the Guillain-Barré syndrome (GBS).¹⁹ A recent study concluded that gliomedin, neurofascin (NF186), NrCAM, and contactin-1 (CNTN1) are target antigens for GBS and CIDP.²⁰ Several findings support the importance of axoglial junction in the pathogenesis of CIDP. Among them, there is pathological evidence that protein expression and distribution are disrupted at the node of Ranvier.²¹ Also, polymorphisms in TAG-1, a protein mediating axoglial junctions, have been associated with IVIg response in CIDP.²²

CNTN1 and contactin-associated protein-1 (CASPR1) are essential for central and peripheral nervous system myelination. These axonal proteins are expressed always as a complex that enables the formation of septate-like axoglial junctions in the paranodal loops of myelinated fibers.^{23,24} Their absence determines potassium channel disorganization, myelin detachment at the paranode, and a decrease in nerve conduction velocities in electrophysiological studies in knockout mice.^{23,25}

We designed a study to investigate the presence of autoantibodies against axonal antigens in sera of a large series of CIDP patients using hippocampal neurons, which express proteins of the axoglial junction,²⁶ to identify relevant target antigens. We found that a subset of CIDP patients have antibodies against conformational epitopes of CNTN1 and the CASPR1/CNTN1 complex, but not against CASPR1. Furthermore, we correlated the clinical features and response to therapy with the presence of these new autoantibodies.

Patients and Methods

Patients

Sera from 46 patients followed in our clinics and fulfilling European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society task force diagnostic criteria for CIDP were included in the study.³ Control samples included 14 healthy controls and 90 with other neurological diseases, including 48 patients with GBS, 23 patients with motor neuron disease, 10 patients with Miller–Fisher syndrome, 8 patients with chronic ataxic neuropathy, and 1 patient with neuromyotonia with positive anti-CASPR2 antibodies.

All patients gave informed consent to participate. The study was approved by the institutional ethics committee of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Hippocampal Neurons Immunocytochemistry and Immunoprecipitation

Rat hippocampal neurons were cultured as previously described.^{27,28} Neurons were grown for 18 to 21 days in 35mm culture plates with coverslips to perform immunocytochemistry (ICC) or in 100mm plates to perform immunoprecipitation (IP) assays.

Culture plates with coverslips were incubated with serum of CIDP patients or healthy controls diluted 1:500 in 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 hour at 37°C and fixed with 2% paraformaldehyde. Secondary goat antihuman IgG Alexa Fluor 488 antibody at 1:1,000 in 1% BSA was incubated for 1 hour at room temperature (RT). Coverslips were mounted with Vectashield with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Each IP experiment required 5 to 7 100mm plates. Serum diluted at 1:100 in culture medium was added to the plates, incubated for 1 hour at 37°C, and washed in cold phosphate-buffered saline (PBS). Plates were incubated with cold lysis buffer (1% triton X-100 in distilled H₂O, 150mM NaCl, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid, 100mM Tris-HCl, and 0.5% deoxycholate acid, pH 7.5) containing protease inhibitor mix (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) in agitation for 1 hour at 4°C. Cell lysate was collected in tubes and centrifugated. Protein A and G agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) were added to sample supernatants. The mix was shaken overnight at 4°C. The sample was centrifugated, supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in Laemmli buffer (BioRad Laboratories, Hercules, CA) plus 5% β-mercaptoethanol. Samples were then boiled for 5 minutes to separate protein A and G beads and spun down at 16,000 × g. Supernatant was separated in 4 to 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Colloidal blue staining was used to reveal the band pattern. Electrophoresis bands specific for the CIDP patient were sent for mass spectrophotometry analysis (Supplementary Methods).²⁹

Western Blot Analysis of Precipitated Proteins

A fraction of the precipitate supernatant of Patient 3 was loaded into a 4 to 8% acrylamide gel. Gel proteins were transferred to a nitrocellulose membrane, and immunoblot was performed with rabbit anti-CNTN1 antibody (Abcam, Cambridge, MA) and mouse anti-CASPR1 antibody diluted 1:1,000. Appropriate antirabbit and antimouse DyLight secondary antibodies (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) were used at 1/7,500 concentration, and band pattern was revealed with an Odyssey Imager (LI-QOR, Lincoln, NE).

Immunocytochemistry on Cells Expressing CNTN1, CASPR1, CNTN1/CASPR1 Complex, and CASPR2

HEK293 cells were grown in culture dishes with coverslips for 24 hours in fetal bovine serum-supplemented Dulbecco modified Eagle medium culture medium. The pRc/CMV.F3 vector

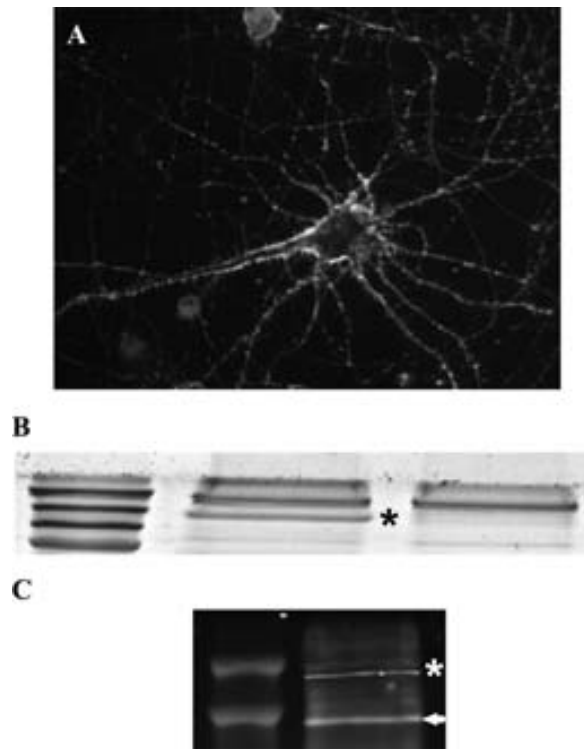


FIGURE 1: Sera of some chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy patients bind and precipitate neuronal proteins. (A) Serum of Patient 1 reacts against hippocampal neurons. (B) Immunoprecipitation of hippocampal neuron lysate of Patient 1 (middle lane) and control (right lane) identifies a distinct band in Patient 1 at 100 to 150 kilodaltons (*black asterisk*) in a polyacrylamide gel electrophoresis stained with colloidal blue. The left lane shows the protein standard. (C) Western blot demonstrates that the hippocampal neuron protein precipitated with serum from Patient 3 contains both CNTN1 (*arrow*) and CASPR1 (*white asterisk*). Rabbit anti-CNTN1 and mouse anti-CASPR1, with appropriate antimouse and antirabbit DyLight secondary antibodies, were used in the immunoblot.

containing F3/CNTN1 cDNA (courtesy of Dr Catherine Faivre-Sarrailh),³⁰ and the pReceiver-M02 containing full-length human CASPR1 cDNA were diluted in Opti-MEM medium and transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) at 60 to 70% cell confluence, and incubated overnight at 37°C. For cotransfection experiments, F3/CNTN1 and CASPR1 vectors were transfected at 20:1 molar ratio. The day after transfection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. For analysis of antibodies against CASPR2, we used HEK cells expressing CASPR2, kindly provided by Dr Dalmau.²⁸ CASPR1 and 2 transfected cells were permeabilized with Triton X-100 0.3% in PBS. Then, cells were blocked for 1 hour with 5% normal goat serum in PBS. Double ICC was performed using patients' sera (1:10 to 1:40) and mouse monoclonal antibodies against CNTN1 and CASPR1 and rabbit polyclonal anti-CASPR2 (Abcam, Cambridge, MA) at 1:5,000, 1:10,000, and 1:1,000 respectively. Goat antihuman IgG Alexa Fluor 488 and goat antimouse/antirabbit IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR) were used as secondary antibodies at 1:1,000 concentration. Coverslips were mounted as described for neuronal ICC.

Teased Nerve Fibers Immunohistochemistry

Female Lewis rats were sacrificed and the sciatic nerves removed. Nerve fibers were teased, transferred to slides in PBS, dried at RT, and stored at -20°C until needed. Teased fiber immunohistochemistry (IHC) was performed as described.³¹ Sera (concentrations 1:100 to 1:1,000) from CIDP patients and controls were incubated for 1 hour. In double IHC assays, the same monoclonal antibodies and appropriate secondary fluorescent antibodies described in ICC experiments were used. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C and secondary antibodies for 1 hour at RT. Slides were mounted with Fluoprep (Biomerieux, France).

Immunoabsorption

Nontransfected and CNTN1-, CASPR1-, or CNTN1/CASPR1-transfected HEK293 cells were grown in 6-well plates and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Sera from CIDP patients testing positive in ICC assays were diluted 1:40 in 5% goat serum in PBS and incubated for 1 hour per well. Supernatant from both transfected and nontransfected culture plates was collected and used for IHC and ICC experiments as described.

Data Collection and Statistical Analysis

Medical records of patients were retrospectively reviewed to retrieve demographic and clinical data, response to treatment, and outcome. Electrophysiological data from patients testing positive for antibodies were also reviewed in detail. All data were recorded in a coded database.

Statistical analysis was performed with Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

Forty-six patients fulfilling diagnostic criteria for CIDP were included in the study. Four of 46 patients' sera (8.6%) reacted strongly against hippocampal neurons (Fig 1A). Sera from these 4 patients and 1 control were used for IP assays. The proteins precipitated with these 4 sera and 1 control sample were separated in a polyacrylamide gel. A protein band of 100 to 150kDa was identified in the precipitate with 3 of the patients' sera but not in the fourth patient or in the healthy control serum (see Fig 1B). CNTN1 was identified with high scores in the band of 100 to 150kDa independently precipitated with each of the 3 patients' sera. CASPR1 was also identified in the precipitate of Patient 3 and confirmed by immunoblot (see Fig 1C and Supplementary Table 1).

The presence of antibodies against CNTN1 or CASPR1 was confirmed with a cell-based assay expressing these proteins. Sera from Patients 1 and 2 were positive for CNTN1 IgG antibodies (Fig 2). Serum from Patient 3 tested negative when examined with CNTN1 and CASPR1 transfected separately. However, this serum reacted with cells coexpressing the CNTN1/CASPR1

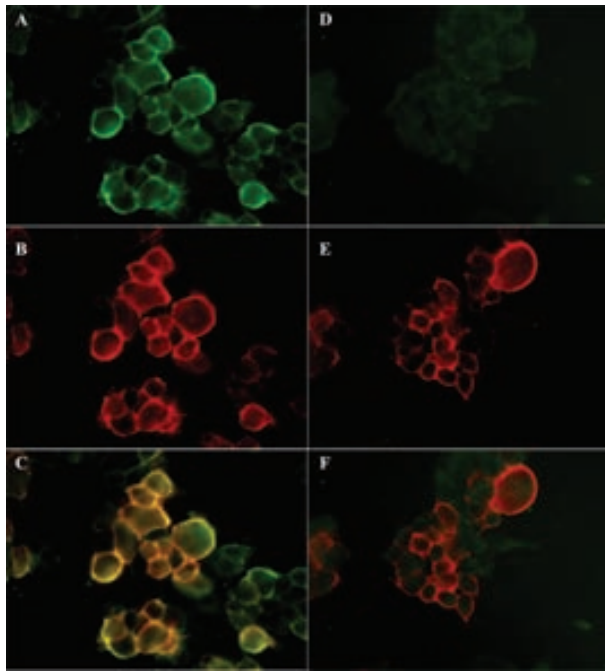


FIGURE 2: Reactivity against CNTN1 was confirmed with CNTN1-transfected HEK293 cells in Patients 1 and 2, whereas none of the controls tested positive. (A) Patient 1 serum shows (B) strong reactivity against CNTN1 and (C) colocalization with the reactivity of a commercial antibody. (D) A serum from a healthy control (E) does not show reactivity against CNTN1 and (F) therefore there is no colocalization with the reactivity of a commercial antibody.

complex (Fig 3). All other CIDP patients, including those with weak reactivity against neurons, and the 104 controls were negative when tested against CNTN1, CASPR1, and CNTN1/CASPR1 using the same cell-based assay ($p = 0.02$, Fisher exact test). To further support the specificity of the reactivity, we tested all 3 positive patients' sera against CASPR2-transfected cells, and all 3 were negative (data not shown).

To confirm the specificity of the findings, teased-nerve IHC, immunoabsorption, and immune competition experiments were performed. All 3 patients' sera reacted against paranodal structures and colocalized with CNTN1 and CASPR1 in teased-nerve IHC. The reactivity of serum from Patients 1 and 2 was abrogated using teased-nerve IHC and ICC experiments after sera had been preabsorbed with cells expressing CNTN1 (Fig 4 and Supplementary Fig 1). However, the reactivity of serum from Patient 3 was preserved after preabsorption with cells expressing CNTN1, CASPR1, and CNTN1/CASPR1 and with nontransfected cells. In immune competition experiments, the incubation of teased-nerve fibers with serum from Patient 1 substantially decreased the binding of monoclonal antibodies to CNTN1, suggesting a blockade of the epitopes targeted by the monoclonal antibody. This did not happen when monoclonal

antibodies were used first and the patient's serum was used afterward (Supplementary Fig 2). No blocking effects were seen with the other 2 positive sera and with serum of a CIDP patient without CNTN1/CASPR1 antibodies (data not shown).

Patients whose sera reacted against CNTN1 or the CNTN1/CASPR1 complex were 2 women and 1 man. Their ages at disease onset (77, 76, and 60 years) were higher than the average for the whole group of CIDP patients (71 vs 51.6, $p = 0.04$, Mann-Whitney). Their demographic and clinical features are described in Table

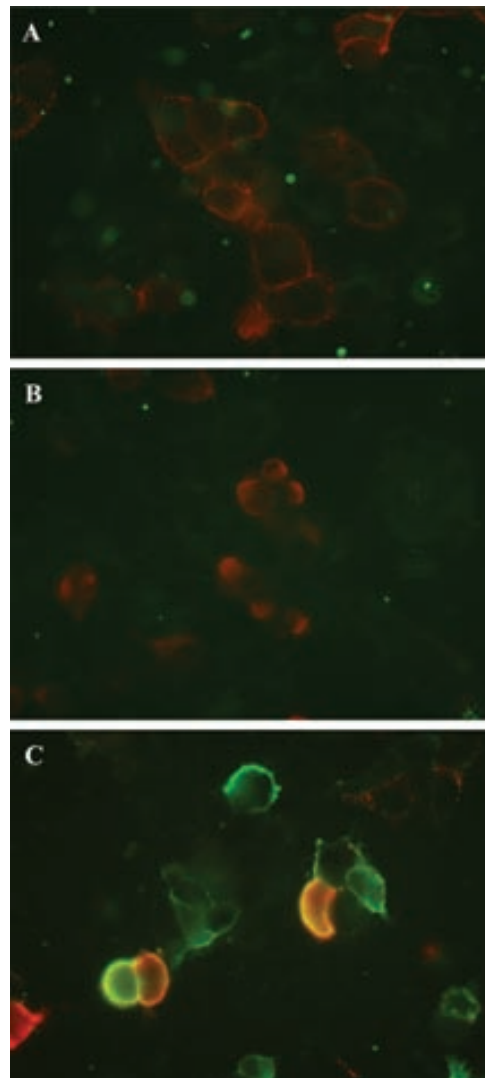


FIGURE 3: Serum from Patient 3 reacted against the CNTN1/CASPR1 complex only when both proteins were coexpressed. (A) Patient 3 serum (green) tests negative against CNTN1-transfected cells and is detected with anti-CNTN1 monoclonal antibody (red). (B) Patient 3 serum (green) tests negative for CASPR1-transfected cells and is detected with anti-CASPR1 monoclonal antibody (red). (C) Positive reactivity of Patient 3 serum (green) against CNTN1/CASPR1-cotransfected cells using anti-CNTN1 antibody (red) to demonstrate colocalization.

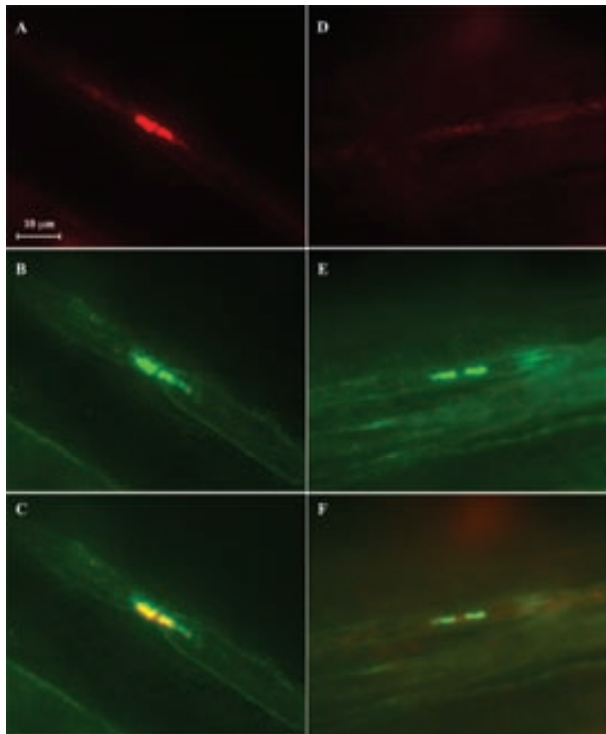


FIGURE 4: Immunoabsorption of positive sera with CNTN1-transfected HEK cells abrogated paranodal reactivity. (A) Reactivity against the paranode on teased-nerve fibers was present when Patient 2 serum was preincubated with non-transfected HEK cells. (D) The reactivity was abolished after preincubation of the serum with CNTN1-transfected cells. (B, E) Anti-CNTN1 monoclonal antibody reactivity. (C, F) Merged images.

1. All 3 patients presented with a rapidly progressive clinical course characterized by predominant motor weakness. Patient 1 became completely paralyzed in 12 weeks, and 1 course of IVIg was ineffective. Cyclosporine was started because she had a history of vertebral collapse. This drug and a second course of IVIg were also ineffective, and prednisone was introduced. After 2 weeks with steroids, she improved significantly. A year later, she was able to walk without assistance, but she required 50mg of prednisone every other day to maintain her walking ability. Patient 3 presented with sensory and motor symptoms. Weakness progressed during 8 weeks until she became wheelchair bound. Two courses of IVIg were only partially effective, and oral prednisone was needed to reach independent but poor ambulation.

Patient 2 was diagnosed in another center and first seen in our unit 1 year after symptom presentation. He presented with symmetrical, rapidly progressive weakness, predominantly involving distal muscles in lower limbs. Distal paresthesias, tingling, joint position impairment in hands and feet, and gait ataxia were also present. Treatment with IVIg was partially effective. Prednisone and

azathioprine were started but only resulted in incomplete improvement. Electrophysiological studies are detailed in Tables 2 and 3. Motor conduction studies showed features consistent with demyelination in all 3 patients. Distal motor latencies were prolonged, and conduction velocities were within the range of a demyelinating neuropathy in Patients 1 and 3. Distal motor latencies were prolonged in all tested nerves in Patient 2, but slowed motor conduction velocities and conduction block were only present in median nerve. However, the most striking finding, common to the 3 patients, was the presence of deeply decreased amplitudes in compound muscle action potentials (CMAPs) and acute denervation in electromyography. Sensory nerve action potentials were absent during the acute phase in Patients 1 and 3 and showed low amplitudes in Patient 2.

Discussion

We report the presence of antibodies against conformational epitopes of the CNTN1/CASPR1 complex in a subset of CIDP patients who had similar clinical features and response to therapy. The identity of the target autoantigens was determined with IP and confirmed with teased-nerve IHC, cell-based assays, and immunoabsorption experiments. The absence of similar findings in 104 controls, including 48 GBS patients, indicates that autoantibodies to CNTN1 or the CNTN1/CASPR1 complex may have a pathogenic role in a subset of CIDP patients, and could be used as a diagnostic biomarker in these patients.

The presence of pathogenic autoantibodies in CIDP has been a matter of research for many years, because the good responses to IVIg and PEx suggested that humoral factors were involved.² Recently, the axoglial junction has been proposed as the target of the autoimmune response.¹⁸ We focused our investigation on this particular region of the nerve and used hippocampal neurons to screen for the presence of sera reactivity against neuronal antigens. Although hippocampal neurons are not involved in CIDP pathogenesis, the molecular machinery involved in myelination processes and proteins of the axoglial junction are common in both the central and peripheral nervous systems.^{32,33} Therefore, we used cultures of dissociated hippocampal neurons, that result in less background than peripheral or central nervous tissue, and have been recently used for the characterization of many relevant antigens of autoimmune encephalitis.³⁴

Our data indicate that antibodies to CNTN1 or CNTN1/CASPR1 complex are likely to be relevant in the pathogenesis of this group of CIDP patients. For instance, cell-based assays confirmed the presence of

TABLE 1: Summary of Clinical Features of Patients with Antibodies against CNTN1 Complex

Patient	Age at Onset, yr; Sex	Initial Symptoms	mRS at Diagnosis	Response to Treatment		CSF Protein Levels ^a ; CSF Cell Count	Electrophysiological Features
				IVIg	Prednisone Other IS		
Patient 1	77; F	Rapidly progressive and severe weakness	5	No	Yes, full doses were needed to maintain partial response	1.62; 1 cell	Demyelination, conduction blocks, low-amplitude CMAPs, acute denervation
Patient 2	60; M	Weakness, predominantly in distal muscles in lower limbs, paresthesias, gait ataxia	4	Only partially	Yes, partial response	2.46; 5 cells	Demyelination, conduction blocks, low-amplitude CMAPs, acute denervation
Patient 3	76; F	Sensory disturbances and weakness	4	Only partially	Yes, partial response	3.75; 13 cells	Demyelination, conduction blocks, low-amplitude CMAPs, acute denervation
Average CIDP without anti-CNTN1 antibodies	51.6 ^b		3 ^c	80% are responders	80% are responders		

^aProtein levels in grams per liter (normal range, <0.45g/l).

^b*p* = 0.04 (Mann-Whitney).

^c*p* = 0.01 (Mann-Whitney). CIDP = chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy; CMAP = compound muscle action potential; CSF = cerebrospinal fluid; F= female; IVIg = intravenous immunoglobulin; M= male; mRS = modified Rankin score; IS: immunosuppressants.

TABLE 2: Electrophysiological Studies: Motor Conduction Studies

Patient No./Nerve	Distal Motor Latency, ms			Amplitude, mV			Conduction Velocity, m/s					
	2 Months after Onset	4 Months after Onset	48 Months after Onset	2 Months after Onset	4 Months after Onset	48 Months after Onset	2 Months after Onset	4 Months after Onset	48 Months after Onset	Normal Values		
Patient 1												
Median, right/left	11.1/9.3	13.5/ND	3.4/ND	<3.9	1.7/1.4	0.2/ND	5.0/ND	>6	19/22	11/ND	53/ND	>50
Ulnar, right/left	6.8/6.3	8.9/ND	3.9/ND	<3.3	0.8/1.9	2.6/ND	2.5/ND	>5	21/22	16/ND	39/ND	>48
Peroneal, right/left	10.3/14.8	15.3/ND	ND/ND	<5	0.4/0.4	0.1/ND	ND/ND	>2	22/22	NA/ND	ND/ND	>42
Patient 2												
Median, right	7.85	4.80	3.85	<3.9	7.6	6.2	9.1	>6	29.9	39.7	42.9	>50
Peroneal, right	7.25	5.55	7.65	<5	1.4	1.6	4.5	>2	NA	NA	36.7	>42
Tibial, left	15.70	10.40	ND	<6	0.3	0.5	ND	>2	NA	NA	ND	>38
Patient 3												
Median, right	10.1	10.1	10.1	<3.9	2.4	2.4	17	>50				
Ulnar, right	6.5	6.5	6.5	<3.3	3.7	3.7	20	>48				
Peroneal, left	14.5	14.5	14.5	<5	0.1	0.1	16	>42				
Tibial, right/left	12.8	12.8	12.8	<6	0.2	0.2	20	>38				

NA = not applicable; ND = not done.

TABLE 3: Electrophysiological Studies: Sensory Conduction Studies

Patient No./Nerve	Amplitude, μ V		Normal Values		Conduction Velocity, m/s			Normal Values
	2 Months after Onset	4 Months after Onset	48 Months after Onset	Normal Values	2 Months after Onset	4 Months after Onset	48 Months after Onset	
Patient 1								
Median, right/left	NR/NR	ND/ND	5/ND	>16	NA/NA	ND/ND	38/ND	>44
Ulnar, right/left	NR/NR	ND/ND	5/ND	>15	NA/NA	ND/ND	42/ND	>42
Radial, right			6	>14			40	>51
Superficial peroneal, right/left	NR/NR	ND/ND	ND/ND	>6	NA/NA	ND/ND	ND/ND	>39
Patient 2								
Sural, right/left	3.7/3.3	ND/ND	ND/ND	ND/8.7	>5	39.0/38.4	ND	39.2
								>38
Patient 3								
Median, right	NR				>16			>44
Ulnar, right	NR				>15			>42
Sural, right	NR				>5			>38

NA = not applicable; ND = not done; NR = no response.

antibodies to CNTN1 and the CNTN1/CASPR1 complex only in sera of patients that precipitated these proteins, and were negative in the rest of our large group of CIDP patients and controls. Furthermore, teased-nerve IHC showed that patient's sera specifically labeled the paranodal region, without involving nodes or juxtaparanodes, and colocalized with the reactivity of monoclonal antibodies to CNTN1 and CASPR1. Finally, immunoabsorption studies confirmed that the only target of the antibody response in the nerve is CNTN1 or the CNTN1/CASPR1 complex, as reactivity against the paranodes was abolished after serum absorption with CNTN1. We postulate that serum from Patient 3, which precipitated both CASPR1 and CNTN1 but did not recognize either protein separately, likely contained antibodies against a conformational epitope of the complex. This is supported by experiments showing reactivity of the serum with CNTN1/CASPR1 complex that could not be abrogated by preadsorption with each individual protein. The low number of CNTN1/CASPR1-coexpressing cells that we were able to obtain limited the experiments of immunoabsorption using cells coexpressing both proteins.

Our 3 antibody-positive patients shared common clinical features. Their age at symptom onset was significantly higher than that of CIDP patients without CNTN1 antibodies. They presented with predominant motor symptoms and a rapidly progressive course, leading to severe weakness with proximal and distal involvement. Neurophysiologic studies fulfilled criteria for demyelination, but a marked reduction of CMAP amplitudes and presence of axonal involvement were evident at early stages of the disease. IVIg was only partially effective in Patients 2 and 3 and ineffective in Patient 1. All 3 patients required prednisone, and the recovery was not complete, likely due to axonal degeneration.

CNTN1 and CASPR1 form a complex and are coexpressed in the nerve.³³ Knockout mice for CASPR or CNTN1 show a very similar phenotype, including electrophysiological studies showing decreased nerve conduction velocities due to an increase in paranodal capacitance secondary to misplacement of potassium channels at the paranode.^{23,25} Decreased conduction velocity is a frequent finding in acquired inflammatory neuropathies; however, our patients had evidence of axonal involvement since the initial examination. The location of the antigen CNTN1 in the axon could favor the early appearance of axonal degeneration. These 2 findings strongly correlate with the electrophysiological findings in our patients and further support the pathogenic role of the CNTN1/CASPR1 antibodies.

During the preparation of this article, Devaux and coworkers²⁰ described the presence of serum reactivity against the node or paranode by teased-nerve IHC in up

to 30% of CIDP patients and 43% of GBS patients. Using transfected cells, they reported that some of the patients had antibodies against neurofascin (NF186), gliomedin, NrCAM, or CNTN1 alone or in combination. These results further strengthen our findings using a different approach. The disagreement in the presence of CNTN1 antibodies in GBS could be due to the disease in our patients having an aggressive onset; some were initially considered as having GBS (Patients 1 and 3), but the follow-up established the diagnosis of CIDP. However, in the CIDP cohort, 7 more patients had a rapidly progressive course (7 of 46, 15.2%). Mean age at onset of these patients was 45 years, significantly lower than the CNTN1/CASPR1-positive patients we describe. Clinical features are heterogeneous but, in general, disease was milder. Two patients had a predominantly motor involvement and electromyographic findings suggestive of acute axonal injury, but unlike anti-CNTN1/CASPR1-positive patients, both responded well to IVIg. The other 5 patients had demyelinating features without prominent axonal involvement in the first electromyogram (Supplementary Table 2).

Intriguingly, we found antibodies against CNTN1 and the CNTN1/CASPR1 complex but not against CASPR1 alone, although its membrane expression is always dimeric with CNTN1. In fact, in CNTN1 mutant mice, CASPR1 is retained intracellularly and is not expressed on the surface.³³ A study with sural nerve biopsies of CIDP patients²¹ showed that nodal structures are disrupted, and there was an increase and disorganization in fluorescence signal with CASPR1 staining. The authors suggested that those changes were specific for CIDP and could be used as diagnostic marker. This overexpression may, in accordance with our results, indicate that CASPR1 is not a primary target in CIDP.

That we are able to identify a relevant antigen in only 6.5% of patients using IP indicates the presence of other unknown antigens in CIDP. However, the finding of new autoantigens even in small subgroups of patients can have important therapeutic implications. For example, the description of anti-MuSK antibodies in a small percentage of patients with myasthenia gravis has been shown to be very important in designing a treatment strategy specific for these patients.³⁵ Studies confirming the presence of antibodies against neurofascin, gliomedin, and NrCAM and the definition of the clinical CIDP subgroups associated with them are needed. Similar IP approaches can help to determine the presence of antibodies against other axoglial proteins of the myelin compartment. Larger studies focused on the clinical features of patients with antibodies to CNTN1/CASPR1 complex will help to better define the phenotype of this disorder.

Acknowledgment

This project was supported with a research grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Fondo de Investigaciones [FIS] Intrasalud; 09/1964; principal investigator, I.I.). E.M.-H. was supported by Instituto de Salud Carlos III FIS FI 08/00285, L.Q. by Instituto de Salud Carlos III FIS CM 09/00017, and G.N.-G. by Instituto de Salud Carlos III FIS CD10/00027.

The funding institutions did not have any role in the study design, data collection, or analysis. The corresponding author had full access to all data and the final responsibility for the decision to submit the article for publication.

We thank E. Ortiz and M. Mané for technical assistance, Dr N. Ortiz for helping in patient assessment, Dr B. C. Kieseier and his group for counseling in nerve IHC, Dr C. Faivre-Sarrailh for providing the CNTN1 vector, Dr J. Dalmau for providing CASPR2-transfected cells, and Dr M. R. Rosenfeld for insightful comments and suggestions.

Authorship

L.Q. and G.N.-G. contributed equally.

Potential Conflicts of Interest

R.R.-G.: expert testimony, Pfizer; grants/grants pending, FIS. J.D.-M.: speaking fees, Genzyme. E.G.: grants/grants pending, Spanish Ministry of Health; patents, No. 7,172,858 Mass Gral Hosp/Hosp Sant Pau. I.I.: consultancy, speaking fees, travel expenses, Grifols S.A.; grants/grants pending, Fondo Investigaciones Sanitarias, Cibernet.

References

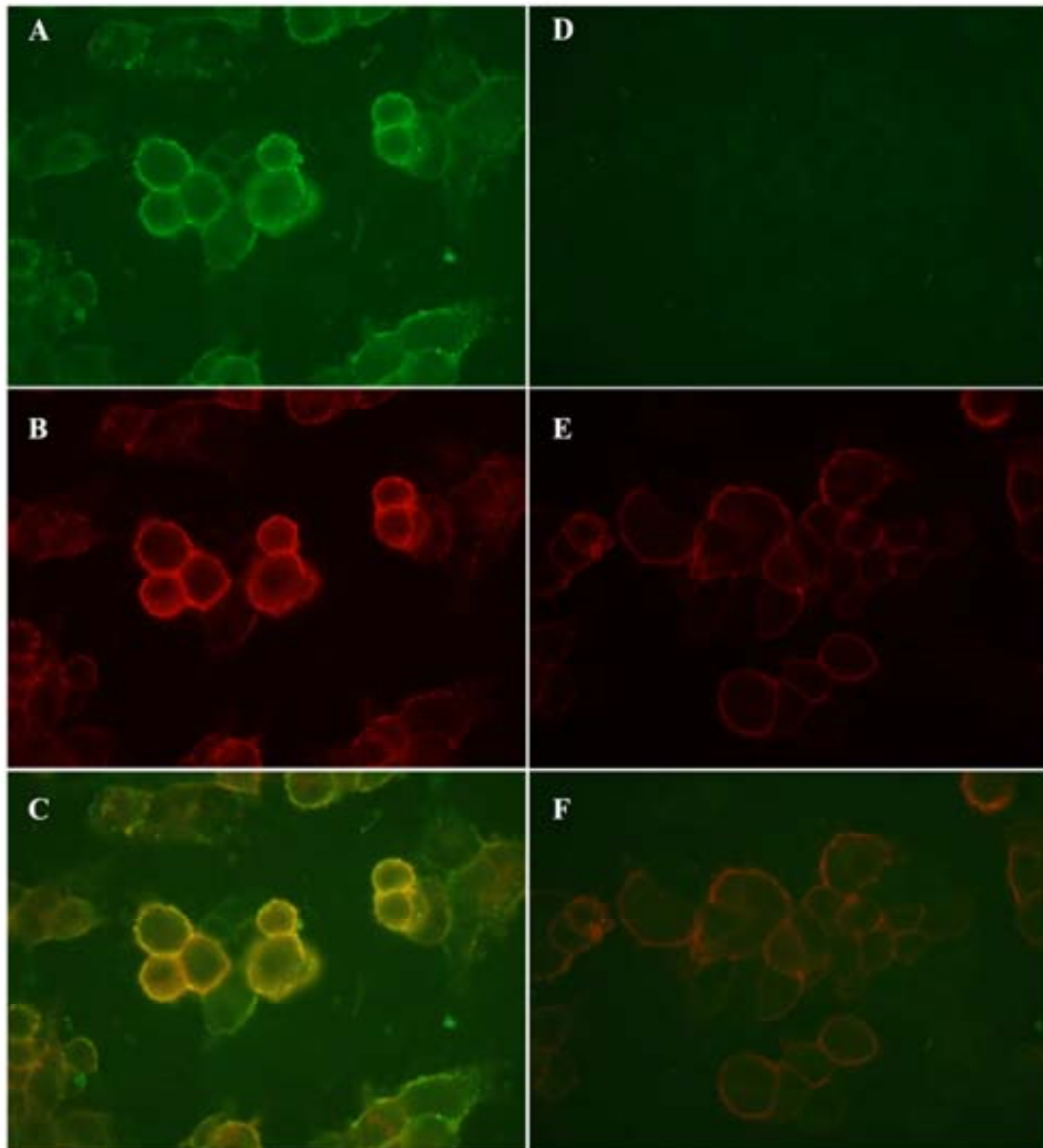
1. Koller H, Kieseier BC, Jander S, Hartung HP. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N Engl J Med* 2005;352:1343–1356.
2. Kieseier BC, Dalakas MC, Hartung HP. Immune mechanisms in chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Neurology* 2002;59(12 suppl 6):S7–S12.
3. Van den Bergh PY, Hadden RD, Bouche P, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society—first revision. *Eur J Neurol* 2010;17:356–363.
4. Brannagan TH III. Current diagnosis of CIDP: the need for biomarkers. *J Peripher Nerv Syst* 2011;16(suppl 1):3–13.
5. Hughes RA, Allen D, Makowska A, Gregson NA. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2006;11:30–46.
6. Dalakas MC, Engel WK. Immunoglobulin and complement deposits in nerves of patients with chronic relapsing polyneuropathy. *Arch Neurol* 1980;37:637–640.
7. Yan WX, Taylor J, Andrias-Kauba S, Pollard JD. Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory

- demyelinating polyneuropathy patients. *Ann Neurol* 2000;47:765–775.
8. Tackenberg B, Jelcic I, Baerenwaldt A, et al. Impaired inhibitory fcgamma receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4788–4792.
9. Kwa MS, van Schaik IN, De Jonge RR, et al. Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies. *Brain* 2003;126(pt 2):361–375.
10. Khalili-Shirazi A, Atkinson P, Gregson N, Hughes RA. Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1993;46(1–2):245–251.
11. Kwa MS, van Schaik IN, Brand A, et al. Investigation of serum response to PMP22, connexin 32 and P(0) in inflammatory neuropathies. *J Neuroimmunol* 2001;116:220–225.
12. Yan WX, Archelos JJ, Hartung HP, Pollard JD. P0 protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol* 2001;50:286–292.
13. Allen D, Giannopoulos K, Gray I, et al. Antibodies to peripheral nerve myelin proteins in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2005;10:174–180.
14. Ingliis HR, Csurhes PA, McCombe PA. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:419–422.
15. Zweiman B, Rostami A, Lisak RP, et al. Immune reactions to P2 protein in human inflammatory demyelinating neuropathies. *Neurology* 1983;33:234–237.
16. Sanvito L, Makowska A, Mahdi-Rogers M, et al. Humoral and cellular immune responses to myelin protein peptides in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:333–338.
17. Gabriel CM, Gregson NA, Hughes RA. Anti-PMP22 antibodies in patients with inflammatory neuropathy. *J Neuroimmunol* 2000;104:139–146.
18. Pollard JD, Armati PJ. CIDP—the relevance of recent advances in Schwann cell/axonal neurobiology. *J Peripher Nerv Syst* 2011;16:15–23.
19. Pruss H, Schwab JM, Derst C, et al. Neurofascin as target of auto-antibodies in Guillain-Barre syndrome. *Brain* 2011;134(pt 5):e173; author reply e174.
20. Devaux JJ, Odaka M, Yuki N. Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barre syndrome. *J Peripher Nerv Syst* 2012;17:62–71.
21. Cifuentes-Diaz C, Dubourg O, Irinopoulou T, et al. Nodes of Ranvier and paranodes in chronic acquired neuropathies. *PLoS One* 2011;6:e14533.
22. Iijima M, Tomita M, Morozumi S, et al. Single nucleotide polymorphism of TAG-1 influences IVIg responsiveness of Japanese patients with CIDP. *Neurology* 2009;73:1348–1352.
23. Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, et al. Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* 2001;30:385–397.
24. Bhat MA, Rios JC, Lu Y, et al. Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron* 2001;30:369–383.
25. Sun XY, Takagishi Y, Okabe E, et al. A novel Caspr mutation causes the shambling mouse phenotype by disrupting axoglia interactions of myelinated nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:1207–1218.
26. Mikami T, Yasunaga D, Kitagawa H. Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *J Biol Chem* 2009;284:4494–4499.

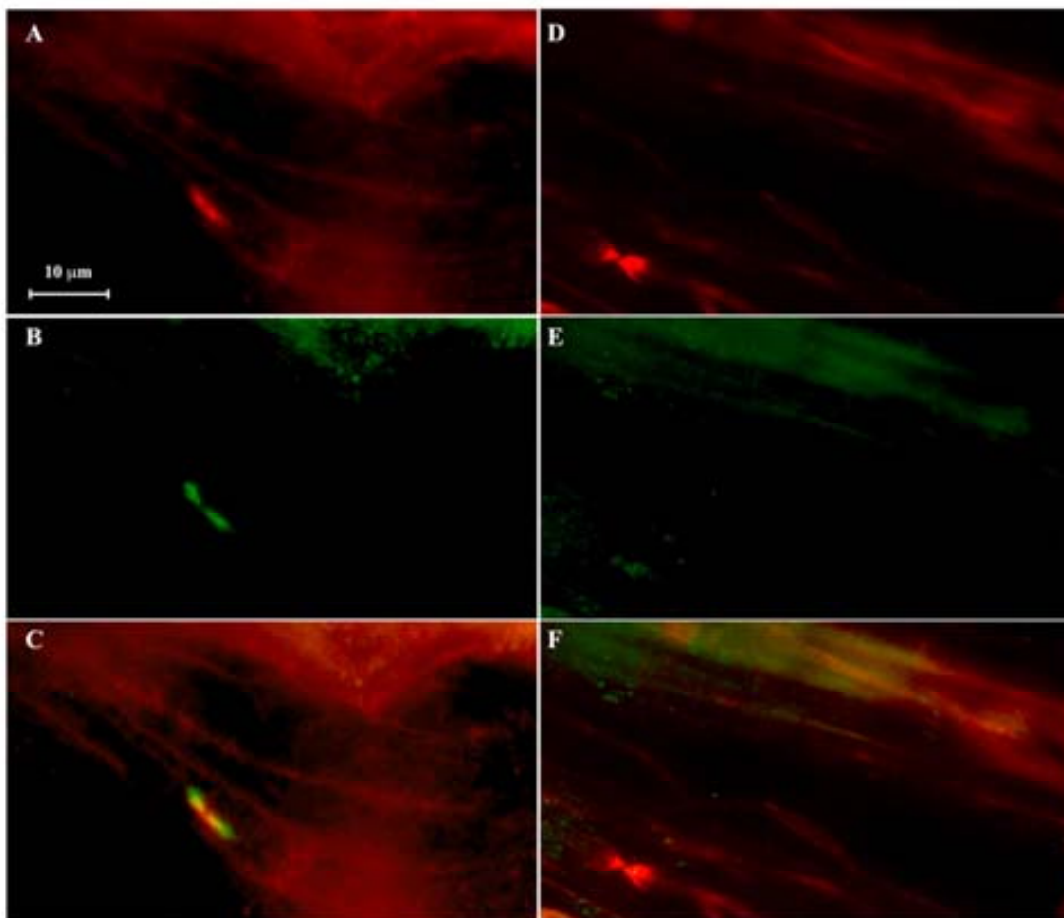
27. Buchhalter JR, Dichter MA. Electrophysiological comparison of pyramidal and stellate nonpyramidal neurons in dissociated cell culture of rat hippocampus. *Brain Res Bull* 1991;26:333–338.
28. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, et al. Investigation of LG11 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010;9:776–785.
29. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006;1:2856–2860.
30. Durbec P, Gennarini G, Buttiglione M, et al. Different domains of the F3 neuronal adhesion molecule are involved in adhesion and neurite outgrowth promotion. *Eur J Neurosci* 1994;6:461–472.
31. Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, et al. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol* 2011;69:303–311.
32. Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:683–690.
33. Thaxton C, Bhat MA. Myelination and regional domain differentiation of the axon. *Results Probl Cell Differ* 2009;48:1–28.
34. Lancaster E, Dalmau J. Neuronal autoantigens—pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol* 2012;8:380–390.
35. Diaz-Manera J, Martinez-Hernandez E, Querol L, et al. Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology* 2012;78:189–193.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



SUPPLEMENTARY TABLE 1

MASS SPECTROMETRY SCORE SUMMARY

Only proteins scoring above the cut-off threshold (50) are shown:

PATIENT 1

PROTEIN	ACCESSION (UNIPROT)	SCORE	UNIQUE PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE (%)
Myosin 10	MYH10_RAT	5950.2	102	49.1
Myosin 9	MYH9_RAT	5746.6	106	48.1
Contactin 1	CNTN1_RAT	2505.5	52	50.8
Vimentin	VIME_RAT	785.6	16	42.7
Keratin type II cytoskeletal 1	K2C1_RAT	189.7	3	5.6
Myosin Ib	MYO1B_RAT	106.4	3	4.0
Keratin type II cytoskeletal 5	K2C5_RAT	86.9	1	2.1
Keratin type II cytoskeletal 10	K2C10_RAT	86.4	2	4.9
Alpha-actinin-1	ACTN1_RAT	84.6	1	1.3
Keratin type II cytoskeletal 14	K2C14_RAT	76.0	2	2.9
Myosin Va	MYO5A_RAT	75.2	1	0.9
Drebrin	DREB_RAT	68.3	1	2.8
Ubiquitin	UBIQ_RAT	57.9	1	21.1
Tubulin alpha-1A	TBA1A_RAT	52.6	1	3.3

chain				
-------	--	--	--	--

PATIENT 2

PROTEIN	ACCESSION (UNIPROT)	SCORE	UNIQUE PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE (%)
Myosin 10	MYH10_RAT	3197.6	49	30.3
Myosin 9	MYH9_RAT	1865.3	29	18.8
Contactin 1	CNTN1_RAT	982.9	19	24.9
Vimentin	VIME_RAT	588.9	10	23.8
Myosin Va	MYO5A_RAT	257.5	3	3.4
Drebrin	DREB_RAT	89.9	2	6.2
Anionic trypsin-1	TRY1_RAT	63.2	1	8.1
Ventricular zone- expressed PH domain- containing protein homolog 1	MELT_RAT	53.7	1	2.3

PATIENT 3

PROTEIN	ACCESSION (UNIPROT)	SCORE	UNIQUE PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE (%)
Myosin 10	MYH10_RAT	1391.5	22	16.3
Contactin associated protein 1	CNTP1_RAT	723.0	10	7.9

Contactin 1	CNTN1_RAT	431.3	8	11.8
Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10_RAT	410.1	8	14.4
Keratin type II cytoskeletal 1	K2C1_RAT	373.3	6	7.2
Myosin 9	MYH9_RAT	214.5	3	2.9
Keratin, type II cytoskeletal 6A	K2C6A_RAT	146.7	2	3.8
Myosin Va	MYO5A_RAT	140.5	2	1.5
Vimentin	VIME_RAT	117.6	2	5.2
Heat shock cognate 71KDa protein	HSP7C_RAT	113.5	2	5.6
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	K22E_RAT	93.6	2	3.4
Dihydrolipoyllysine- residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	ODP2_RAT	77.7	1	2.4
Serine/threonine- protein kinase D1	KPCD1_RAT	77.2	1	1.6

Complement C4	CO4_RAT	74.7	1	0.7
Anionic trypsin-1	TRY1_RAT	58.0	1	8.1

CONTROL

PROTEIN	ACCESSION (UNIPROT)	SCORE	UNIQUE PEPTIDES	SEQUENCE COVERAGE (%)
Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_RAT	1555.3	26	64.8
Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3_RAT	1155.6	26	61.7
Actin, cytoplasmic 1	ACTB_RAT	1083.9	23	58.1
Actin, aortic smooth muscle	ACTA_RAT	643.7	16	30.5
Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4_RAT	634.6	12	28.6
F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB_RAT	574.6	14	47.4
F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAZA2_RAT	403.4	7	36.0
Actin-related protein 2	ARP2_RAT	375.8	9	22.1
Tropomodulin-2	TMOD2_RAT	344.5	5	17.1

F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAZA1_RAT	331.8	6	31.1
60S ribosomal protein L13	RL13_RAT	320.0	6	25.6
Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	G3P_RAT	301.4	4	18.0
ADP/ATP translocase 1	ADT1_RAT	192.5	4	14.4
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2_RAT	191.5	6	15.7
Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	ARC1A_RAT	99.4	3	10
60S ribosomal protein L19	RL19_RAT	90.5	2	13.3
Keratin type II cytoskeletal 5	K2C5_RAT	85.1	1	2.1
Keratin, type II cytoskeletal 73	K2C73_RAT	79.3	1	2.2
Anionic trypsin-1	TRY1_RAT	52.6	1	8.1

Supplementary Methods

In-gel digestion and mass spectrometry (MS) analysis

The protein bands of interest were excised, trypsinized and analyzed on an Esquire HCT ion trap mass spectrometer (Bruker). Data processing for protein identification was performed using Protein Scape 3.0 (Bruker). Proteins were identified using Mascot to search the Swiss-Prot 57.4 (Rattus database). MS/MS spectra were searched with precursor mass tolerance of 1.5 Da, fragment tolerance of 0.5 Da, trypsin specificity with a maximum of one missed cleavage, cysteine carbamidomethylation set as fixed modification and methionine oxidation. Positive identification criterion was set as an individual Mascot Score for each peptide MS/MS spectrum higher than the corresponding homology threshold score. False positive rate for Mascot protein identification was measured by searching randomized decoy database, and estimated to be below 4%. Mascot Score Histogram Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ion scores higher than 28 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits. Protein scores of 100 or more were considered relevant to restrict the analysis to proteins highly enriched in the precipitate.

The mass spectrometry protein identification analysis was performed at the Proteomics Laboratory at Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), a member of the ProteoRed-ISCI network of proteomic facilities in Spain.

SUPPLEMENTARY TABLE 2

	Age at onset, sex	mRS at diagnosis	Initial Symptoms	Electrophysiological features	Response to treatment	
					IVIg	Other IS (response)
1	50, Female	3	Sensory-motor. Proximal and distal weakness.	Slow NCV and low amplitude CMAPs. Prolonged DML. Absent SNAPs	Excellent	Prednisone (good)
2	63, Female	3	Pure sensory ataxia	Prolonged DML, slow NCV.	Excellent	Prednisone (good)
3	68, Female	3	Sensory-motor. Predominantly proximal weakness. Neuropathic pain.	F-wave absence, decreased CMAPs	Not done	Prednisone (good)
4	24, Male	4	Predominantly motor.	Slow NCV, prolonged DML, temporal dispersion of CMAP, conduction blocks, Acute denervation	Good	None
5	58, Female	4	Sensory-motor plus ataxia, proximal and distal involvement.	Slow NCV, low amplitude CMAPs, Acute denervation	Good	Methotrexate (good), Azathioprine (partial)

6	9, Female	3	Sensory-motor, predominantly proximal weakness.	Low amplitude CMAPs and SNAPs. Prolonged DML	Excellent	None
7	47, Male	3	Predominantly motor. Proximal and distal.	Conduction blocks	Good	Prednisone (good), azathioprine (no), methotrexate (no), cyclosporine (no), cyclophosphamide (good)

Supp. Table 1. Summary of clinical features of patients with rapidly progressive CIDP negative for anti-CNTN1/CASPR1 antibodies. mRS: modified Rankin Score; NCV: nerve conduction velocities; CMAPs: compound muscle action potentials; DML: distal motor latencies; SNAPs: sensory nerve action potentials.

6. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. ARTÍCULO I.

6.1.1. Síntesis resultados

En las neuropatías autoinmunes agudas se han descrito diferentes patrones de reactividad antigangliósido. El SGB clásico se caracteriza por un predominio de la clínica motora pero hay una variante de SGB de predominio sensitivo cuyos criterios diagnósticos fueron descritos a principios de los años 80. La variante sensitiva del SGB se caracteriza por la presencia de una neuropatía sensitiva aguda, con ausencia de reflejos, de curso monofásico y con aumento de las proteínas en el LCR y que muestra características neurográficas sugestivas de desmielinización. Sin embargo la literatura existente al respecto se reduce a series de casos clínicos en los que no se describe signo de Romberg en la exploración. Más adelante han sido descritas series de casos con neuropatía sensitivo-atáxica, sin reflejos y elevación de las proteínas en LCR con patología desmielinizante en el nervio que, probablemente, pertenecen también al espectro del SGB. Sin embargo los casos con ataxia aguda y arreflexia que cumplen criterios para la inclusión en el SGB son raros, por lo que la inclusión de la neuropatía atáxica aguda (ASAN) como variante del SGB es controvertida. Estos casos presentan un cuadro estereotipado de alteración sensitiva pura, ataxia, areflexia y signo de Romberg positivo con conducciones motoras normales o que muestran signos de desmielinización.

Los anticuerpos antigangliósidos son un marcador diagnóstico útil en el SGB. Identifican subgrupos de pacientes específicos y se han demostrado patogénicos en algunos casos. Las reactividades de anticuerpos antigangliósido en ASAN no han sido estudiadas de forma extensa. Algunos autores identifican anticuerpos contra GD1b y otros gangliósidos con epítomos disialosil (GD3, GQ1b, GT1a) en

pacientes aislados pero no se ha realizado nunca la evaluación sistemática de las reactividades antigangliósido de pacientes con ASAN. Por otro lado, en el SMF y variantes parciales que cursan únicamente con ataxia (clasificadas como SGB atáxico) se ha descrito la presencia de anticuerpos contra GQ1b. Es controvertido si la ASAN forma parte del espectro SMF o forma una entidad diferenciada dentro del espectro del SGB. Nuestra hipótesis fue que definir las reactividades antigangliósido de los pacientes con ASAN y sus correlatos clínicos nos permitiría identificar si, efectivamente, se trata de una variante SGB y discriminar nosológicamente aquellos pacientes con ataxia de origen cerebeloso de aquellos de origen periférico y causa autoinmune.

Para ello seleccionamos todos los pacientes con diagnóstico de sospecha de ASAN de una base de datos con más de 3000 sueros enviados para analizar reactividades antigangliósido y recogidos entre 2005 y 20010. Los criterios para incluir a los pacientes en el estudio fueron: presencia de un síndrome sensitivo-atáxico puro, en ausencia o disminución de reflejos y con alteración de la propiocepción. Aquellos pacientes con oftalmoparesia o debilidad muscular manifiesta fueron excluidos. Las historias clínicas fueron revisadas retrospectivamente y los datos epidemiológicos, clínicos y electrofisiológicos anotados. La reactividad antigangliósido fue estudiada mediante ELISA y cromatografía de capa fina y se emplearon experimentos de inhibición competitiva fueron empleados para definir la especificidad de la reacción. Dieciséis pacientes reunieron los criterios definidos a priori. Dos de los dieciséis fueron excluidos porque recibieron un diagnóstico alternativo en el curso de la enfermedad (neuronopatía anti-Hu y toxicidad por metronidazol). Dos pacientes más fueron excluidos por ausencia de datos clínicos. Uno de ellos era positivo para GD1b. Los otros 12 pacientes pudieron ser analizados con detalle. De los 12,

5 pacientes resultaron negativos en el estudio de anticuerpos antigangliósido. Los pacientes negativos para anticuerpos antigangliósido tenían una media de edad fue 67 años y en dos de ellos había un antecedente infeccioso reconocible. Tres respondieron de forma excelente a las IVIg, uno respondió parcialmente y otro recuperó espontáneamente sin tratamiento.

Los 7 pacientes positivos para anticuerpos antigangliósido tenían una edad media de 59 años, todos ellos se presentaron con una infección respiratoria de vías altas precedente y la presencia de parestesias e inestabilidad fueron los síntomas iniciales en todos ellos. Los reflejos musculares profundos estaban ausentes en todos los pacientes y la coordinación estaba claramente afectada incluyendo signo de Romberg positivo en todos ellos. De forma sorprendente 5 pacientes presentaban ptosis palpebral en la exploración, sin evidencia de oftalmoparesia. Finalmente, dos de los pacientes presentaron afectación bulbar significativa. Todos los pacientes con anticuerpos antigangliósido positivos presentaron reactividad contra el epítipo disialosil. Cinco de estos 7 pacientes reaccionaban contra al menos 3 de los gangliósidos que contienen dicho epítipo. Sólo 2 pacientes reaccionaban de forma aislada contra gangliósidos conteniendo epítipos disialosil. El resto presentaban grados variables de reactividad contra otros gangliósidos que no presentan dicho epítipo en su estructura. Dos de ellos, con afectación bulbar, presentaban reactividad contra NeuNAc(α 2-3)Gal. El isotipo de los anticuerpos antigangliósido de todos los pacientes era IgG. Cinco de los 7 pacientes tenían, al menos, un estudio EMG disponible. El estudio electrofisiológico fue normal en 3 pacientes, uno de ellos mostró amplitudes disminuidas en el potencial sensitivo y el otro presentaba abolición de los potenciales sensitivos y latencias motoras distales alargadas con disminución de las velocidades de conducción en la neurografía motora.

6.1.2. Relevancia

El estudio describe las características clínicas, electrofisiológicas y el patrón de reactividad de anticuerpos antigangliósido de un grupo homogéneo de pacientes con ataxia sensitiva (como demuestra la presencia de signo de Romberg en todos ellos), arreflexia y alteración propioceptiva. A pesar de que los estudios neurográficos no demostraron desmielinización, el inicio rápido, el curso monofásico, la presencia de una infección precedente reciente y la respuesta a IVIg sugieren firmemente la pertenencia de este subgrupo de pacientes al espectro del SGB. Además, la demostración de que la reactividad antigangliósido está dirigida contra epítomos disialosil así como la presencia de signo de Romberg permite distinguir el ASAN, en el que la ataxia es de origen periférico, del SMF y variantes en los que el signo de Romberg es negativo (sugiriendo origen central de la ataxia) y en los que la reactividad antigangliósido está dirigida contra el epítomo NeuNAcNeuNAcGal. Este estudio, que supone la serie de casos de ASAN más grande publicada, determina que el ASAN pertenece al espectro clínico y patogénico del SGB y amplía el espectro de epítomos reconocidos por los anticuerpos antigangliósido asociados a fenotipos clínicos específicos.

6.2. ARTÍCULO II.

6.2.1. Síntesis resultados

La CIDP es la neuropatía autoinmune crónica más frecuente y determina una discapacidad significativa en hasta el 50% de los pacientes. Se trata de una enfermedad heterogénea para la cual no existen biomarcadores, por lo que su diagnóstico se basa en unos criterios clínicos y electrofisiológicos relativamente amplios. Aunque su causa es desconocida, algunas de sus características clínicas y patológicas sugieren que su patogenia es autoinmune. El conocimiento disponible de la inmunopatogenia de la CIDP es muy escaso, aunque se ha propuesto un papel preponderante de las células B y los autoanticuerpos. La respuesta mayoritariamente buena de los pacientes con CIDP a las IVIg y al recambio plasmático, la presencia de depósitos de inmunoglobulinas y complemento en la superficie de las fibras nerviosas en las biopsias de nervio sural, la aparición de desmielinización en el nervio de rata tras la transferencia pasiva de IgG de pacientes con la enfermedad y diversos trabajos experimentales describiendo anticuerpos contra anticuerpos de la mielina apoyan el papel de los anticuerpos en su patogenia. A pesar de ello los anticuerpos identificados hasta el momento son relativamente poco específicos de la enfermedad y dudosamente patogénicos, motivo por el cual no han podido ser utilizados como marcadores de la enfermedad. El hallazgo de alteraciones en la región del nodo de Ranvier y adyacentes en las biopsias de nervio sural de pacientes con CIDP así como la descripción de anticuerpos contra antígenos de dicha región en el SGB ha puesto el foco en la relevancia de la región nodal como posible diana de autoanticuerpos en la CIDP. En nuestro estudio nos propusimos, de forma no sesgada, buscar autoanticuerpos en la CIDP que puedan ser útiles para el diagnóstico de la enfermedad y que puedan contribuir a explicar la patogenia de

la enfermedad. Dado que mayoritariamente la búsqueda de autoanticuerpos se había centrado en la mielina con escaso resultado decidimos focalizar la búsqueda en antígenos neuronales y, en concreto, en neuronas hipocampales que, a pesar de no ser relevantes en la patogenia de la enfermedad, comparten la mayor parte de la maquinaria de mielinización con las neuronas que conforman el nervio periférico.

En la búsqueda de autoanticuerpos partimos de una muestra de 46 pacientes que cumplían criterios diagnósticos de CIDP y a los que realizamos el seguimiento en nuestra Unidad. Como muestras control incluimos 14 controles sanos, 48 pacientes con SGB, 10 pacientes con SMF, 23 pacientes con enfermedad de neurona motora, 8 pacientes con neuropatía atáxica crónica y 1 paciente con neuromiotonía y anticuerpos anti-CASPR2. Tomando el suero de estos pacientes realizamos inmunocitoquímica sobre las neuronas hipocampales para seleccionar aquellos pacientes con anticuerpos IgG dirigidos contra estructuras neuronales. Aquellos sueros que mostraban mayor positividad en la inmunocitoquímica fueron utilizados para experimentos de inmunoprecipitación con las neuronas. El precipitado fue corrido en un gel de poliacrilamida y el patrón de bandas de electroforesis revelado mediante azul coomassie. Las bandas diferentes entre suero de paciente y controles fueron extraídas y enviadas a análisis por espectrometría de masas. Aquellas proteínas presentes únicamente en el precipitado con suero de pacientes y no en el de controles se analizaron para evaluar su potencial relevancia. Las proteínas identificadas por espectrometría de masas y candidatas a ser autoantígenos en la CIDP fueron expresadas en la línea humana de células HEK293 mediante vectores de expresión en mamíferos y se realizó inmunocitoquímica con el suero de los pacientes y anticuerpos monoclonales apropiados para evaluar si existía colocalización entre ambos. Para

caracterizar la especificidad de la reacción, realizamos inmunohistoquímica sobre preparaciones de nervio “teased” (fascículos aislados) y experimentos de inhibición. Finalmente, en aquellos pacientes con anticuerpos contra antígenos relevantes recogimos los datos clínicos y electrofisiológicos.

Encontramos 7 pacientes que reaccionaban contra neuronas de hipocampo (15,2%), de los que 4 reaccionaban de forma intensa contra las neuronas de hipocampo. Esos 4 sueros fueron utilizados para experimentos de inmunoprecipitación, detectándose la proteína contactin-1 (CNTN1) en 3 de ellos. En uno de estos 3 además se detectó la proteína contactin-associated protein 1 (CASPR1). En uno de los pacientes no se detectó ninguna proteína relevante. En los experimentos con células transfectadas detectamos anticuerpos contra CNTN1 en 2 de los pacientes que precipitaban CNTN1, mientras el tercer paciente, que precipitaba simultáneamente CNTN1 y CASPR1 sólo reaccionaba contra las células cuando CNTN1 y CASPR1 eran co-transfectadas y no contra ninguna de ellas de forma individual. Ningún otro paciente o control reaccionó contra células transfectadas con CNTN1, CASPR1 o ambas co-transfectadas. Los 3 pacientes con anticuerpos contra el complejo CNTN1 presentaban un patrón de tinción paranodal en las preparaciones de nervio “teased”. La reactividad, tanto contra el nervio como contra las células transfectadas, desaparecía en los pacientes con anticuerpos contra CNTN1 al pre-incubar el suero con células transfectadas con CNTN1 pero no al incubarlo con células no transfectadas. La reactividad contra el paranodo no desaparecía sin embargo en el paciente con anticuerpos contra el dímero CNTN1/CASPR1 al pre-incubar el suero con células transfectadas con CNTN1, CASPR1 o CNTN1/CASPR1, probablemente debido al escaso número conseguido de células que expresen ambas proteínas.

Al analizar los datos clínicos de los pacientes con anticuerpos contra el complejo CNTN1 evidenciamos un patrón clínico común y diferente a las CIDP consideradas típicas. Los 3 pacientes presentaban un inicio agresivo y relativamente rápido (dos de ellos fueron clasificados inicialmente como SGB y posteriormente reclasificados ante la presencia de recaídas). Todos ellos tenían una edad media superior a los pacientes sin anticuerpos contra CNTN1, predominio motor marcado, daño axonal de inicio y ausencia de respuesta a las IVIg aunque con respuesta parcial en dos pacientes y completa en el tercero a la prednisona.

Aunque el objetivo del estudio no era dilucidar el potencial patogénico de los anticuerpos contra el complejo CNTN1, existen algunos datos que sugieren que dichos anticuerpos podrían serlo. En primer lugar su especificidad y la determinación de un fenotipo homogéneo. En segundo lugar el hecho de que su diana es clave en la mielinización del sistema nervioso periférico y en la formación del nodo de Ranvier, estructura fundamental para la transmisión del impulso nervioso. Y, finalmente, porque los modelos murinos knock-out para CNTN1 presentan una neuropatía con disminución de amplitudes motoras y enlentecimiento de las velocidades de conducción cuyo patrón es muy similar al que presentaban los estudios electrofisiológicos en nuestros pacientes.

6.2.2. Relevancia

Este trabajo identifica un subgrupo de pacientes con CIDP (6.5% del total) con anticuerpos contra el complejo CNTN1/CASPR1 que, a pesar de estar presentes en un porcentaje pequeño, identifica un fenotipo homogéneo de pacientes con características clínicas y pronósticas que se desvían de la CIDP típica, motivo por el cual puede ser utilizado como biomarcador tanto diagnóstico como pronóstico. Además pone de relieve la existencia de otros autoanticuerpos

neuronales cuyas reactividades todavía han de ser identificadas como demuestra la existencia de pacientes (4) que reaccionan contra neuronas a pesar de que el antígeno no haya sido identificado mediante espectrometría de masas.

Adicionalmente este estudio sugiere que la CIDP es, en realidad, un conjunto de síndromes con algunas características comunes desde el punto de vista clínico y electrofisiológico pero muy heterogéneo cuando se analizan con detalle la epidemiología, las fenotipos clínicos y la respuesta terapéutica.

Por otro lado nuestro estudio sugiere que la identificación de autoanticuerpos específicos puede ayudar a definir con precisión subgrupos dentro de la CIDP con patogenia, fenotipo y respuesta a tratamiento diversas y, por tanto, con aplicación clínica inmediata. Por esta razón el artículo ha sido elegido para publicación en una de las revistas de mayor prestigio en neurología clínica.

7. CONCLUSIONES

- En pacientes con neuropatía atáxica aguda se detecta una respuesta inmunológica dirigida contra gangliósidos que comparten la especificidad antigénica “epítipo disialosil”. Este tipo de reactividad antigénica compartida solo puede identificarse si el estudio incluye una batería amplia de gangliósidos.
- La presencia de estos autoanticuerpos antigangliósido demuestra que la neuropatía atáxica aguda se asocia a una respuesta inmunológica transitoria y apoya su inclusión dentro del espectro del síndrome de Guillain Barré
- El suero de un subgrupo de pacientes con CIDP reconoce antígenos en las neuronas hipocampales en cultivo. Uno de estos antígenos es la proteína Contactina-1.
- Los pacientes con CIDP y anticuerpos contra el complejo contactina-1 constituyen un subgrupo de enfermos con un fenotipo homogéneo caracterizado por inicio agudo, gravedad clínica y escasa respuesta a IgeV.

- Los anticuerpos frente al complejo contactina-1 son el primer marcador con implicaciones diagnósticas y pronósticas identificado en la CIDP.

8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AChR: Receptor de acetilcolina

AIDP: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda

AMAN: Neuropatía axonal motora aguda

AMSAN: Neuropatía axonal sensitivo-motora aguda

ASAN: Neuropatía sensitivo-atáxica aguda

BHN: Barrera hemato-neural

CAMs: Moléculas de adhesión celular

CASPR1: contactin-associated protein-1

CASPR2: contactin-associated protein-2

CIDP: Poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica

CMT: Charcot-Marie-Tooth

CNTN1: Contactin-1

CPA: Célula presentadora de antígenos

EAN: Neuritis alérgica experimental

FcR: Receptor de porción Fc de inmunoglobulina

GMD: Gliomedin

GRD: Gánglio raquídeo dorsal

IFN: Interferon

IL1: Interleucina 1

IL6: Interleucina 6

IL10: Interleucina 10

LCR: Líquido cefaloraquídeo

MAG: Glicoproteína asociada a la mielina

MG: Miastenia gravis

MGUSP: Polineuropatía asociada a gammapatía monoclonal de significado incierto

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MusK: Kinasa específica de músculo

NdR: Nodo de Ranvier

NF155: Neurofascin 155

NF186: Neurofascin-186

NMM: Neuropatía motora multifocal

POEMS: Polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y alteraciones cutáneas

SGB: Síndrome de Guillain-Barré

SMF: Síndrome de Miller-Fisher

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

TCR: Receptor de célula T

TLR: Toll-like receptor

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Thaxton C, Bhat MA. Myelination and regional domain differentiation of the axon. *Results Probl Cell Differ* 2009;48:1-28.
2. Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:683-690.
3. Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci* 2012;35:123-134.
4. Buttermore ED, Thaxton CL, Bhat MA. Organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. *J Neurosci Res* 2013;91:603-622.
5. Waxman SG, Ritchie JM. Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol* 1993;33:121-136.
6. Ogawa Y, Schafer DP, Horresh I, et al. Spectrins and ankyrinB constitute a specialized paranodal cytoskeleton. *J Neurosci* 2006;26:5230-5239.
7. Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E. Mechanisms and roles of axon-schwann cell interactions. *J Neurosci* 2004;24:9250-9260.
8. Rios JC, Rubin M, St Martin M, et al. Paranodal interactions regulate expression of sodium channel subtypes and provide a diffusion barrier for the node of ranvier. *J Neurosci* 2003;23:7001-7011.
9. Takeda Y, Murakami Y, Asou H, Uyemura K. The roles of cell adhesion molecules on the formation of peripheral myelin. *Keio J Med* 2001;50:240-248.
10. Bennett V, Lambert S. Physiological roles of axonal ankyrins in survival of premyelinated axons and localization of voltage-gated sodium channels. *J Neurocytol* 1999;28:303-318.
11. Davis JQ, Lambert S, Bennett V. Molecular composition of the node of ranvier: Identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 1996;135:1355-1367.
12. Zhang X, Davis JQ, Carpenter S, Bennett V. Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *J Biol Chem* 1998;273:30785-30794.
13. Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, et al. Gliomedin mediates schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of ranvier. *Neuron* 2005;47:215-229.
14. Saito F, Moore SA, Barresi R, et al. Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* 2003;38:747-758.
15. Pedraza L, Huang JK, Colman DR. Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron* 2001;30:335-344.

16. Bhat MA, Rios JC, Lu Y, et al. Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/caspr/paranodin. *Neuron* 2001;30:369-383.
17. Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, Weber L, Peles E, Ranscht B. Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* 2001;30:385-397.
18. Pillai AM, Thaxton C, Pribisko AL, Cheng JG, Dupree JL, Bhat MA. Spatiotemporal ablation of myelinating glia-specific neurofascin (nfasc NF155) in mice reveals gradual loss of paranodal axoglial junctions and concomitant disorganization of axonal domains. *J Neurosci Res* 2009;87:1773-1793.
19. Tait S, Gunn-Moore F, Collinson JM, et al. An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glia junction. *J Cell Biol* 2000;150:657-666.
20. Gollan L, Sabanay H, Poliak S, Berglund EO, Ranscht B, Peles E. Retention of a cell adhesion complex at the paranodal junction requires the cytoplasmic region of caspr. *J Cell Biol* 2002;157:1247-1256.
21. Sun XY, Takagishi Y, Okabe E, et al. A novel caspr mutation causes the shuffling mouse phenotype by disrupting axoglial interactions of myelinated nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:1207-1218.
22. Davisson MT, Bronson RT, Tadenev AL, et al. A spontaneous mutation in contactin 1 in the mouse. *PLoS One* 2011;6:e29538.
23. Berglund EO, Murai KK, Fredette B, et al. Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* 1999;24:739-750.
24. Arroyo EJ, Xu YT, Zhou L, et al. Myelinating schwann cells determine the internodal localization of Kv1.1, Kv1.2, Kvbeta2, and caspr. *J Neurocytol* 1999;28:333-347.
25. Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, et al. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtapanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol* 2003;162:1161-1172.
26. Tzimourakas A, Giasemi S, Mouratidou M, Karagogeos D. Structure-function analysis of protein complexes involved in the molecular architecture of juxtapanodal regions of myelinated fibers. *Biotechnol J* 2007;2:577-583.
27. Salzer JL. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* 2003;40:297-318.
28. Maurel P, Einheber S, Galinska J, et al. Nectin-like proteins mediate axon schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination. *J Cell Biol* 2007;178:861-874.
29. Chan JR, Jolicoeur C, Yamauchi J, et al. The polarity protein par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science* 2006;314:832-836.
30. Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, et al. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol* 2011;69:303-311.

31. Kearney JA, Buchner DA, De Haan G, et al. Molecular and pathological effects of a modifier gene on deficiency of the sodium channel Scn8a (na(v)1.6). *Hum Mol Genet* 2002;11:2765-2775.
32. Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:208-212.
33. Kieseier BC, Hartung HP, Wiendl H. Immune circuitry in the peripheral nervous system. *Curr Opin Neurol* 2006;19:437-445.
34. Meyer Zu Horste G, Heidenreich H, Lehmann HC, et al. Expression of antigen processing and presenting molecules by schwann cells in inflammatory neuropathies. *Glia* 2010;58:80-92.
35. Meyer zu Horste G, Hartung HP, Kieseier BC. From bench to bedside--experimental rationale for immune-specific therapies in the inflamed peripheral nerve. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3:198-211.
36. Griffin JW, Li CY, Ho TW, et al. Pathology of the motor-sensory axonal guillain-barre syndrome. *Ann Neurol* 1996;39:17-28.
37. Harvey GK, Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Non-neural-specific T lymphocytes can orchestrate inflammatory peripheral neuropathy. *Brain* 1995;118 (Pt 5):1263-1272.
38. Schneider-Hohendorf T, Schwab N, Uceyler N, Gobel K, Sommer C, Wiendl H. CD8+ T-cell immunity in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology* 2012.
39. Ma JJ, Nishimura M, Mine H, et al. HLA and T-cell receptor gene polymorphisms in guillain-barre syndrome. *Neurology* 1998;51:379-384.
40. Sinha S, Prasad KN, Jain D, Nyati KK, Pradhan S, Agrawal S. Immunoglobulin IgG fc-receptor polymorphisms and HLA class II molecules in guillain-barre syndrome. *Acta Neurol Scand* 2010;122:21-26.
41. Harness J, McCombe PA. Increased levels of activated T-cells and reduced levels of CD4/CD25+ cells in peripheral blood of guillain-barre syndrome patients compared to controls. *J Clin Neurosci* 2008;15:1031-1035.
42. McCombe PA, Csurhes PA. T cells from patients with guillain-barre syndrome produce interferon-gamma in response to stimulation with the ganglioside GM1. *J Clin Neurosci* 2010;17:537-538.
43. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 2013;38:414-423.
44. d'Hennezel E, Bin Dhuban K, Torgerson T, Piccirillo CA. The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2012;49:291-302.
45. Fujio K, Okamura T, Sumitomo S, Yamamoto K. Regulatory cell subsets in the control of autoantibody production related to systemic autoimmunity. *Ann Rheum Dis* 2013;72 Suppl 2:ii85-9.

46. Sanvito L, Makowska A, Gregson N, Nemni R, Hughes RA. Circulating subsets and CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Autoimmunity* 2009;42:667-677.
47. Chi LJ, Wang HB, Wang WZ. Impairment of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2008;13:54-63.
48. Chi LJ, Wang HB, Zhang Y, Wang WZ. Abnormality of circulating CD4(+)CD25(+) regulatory T cell in patients with guillain-barre syndrome. *J Neuroimmunol* 2007;192:206-214.
49. Huang S, Li L, Liang S, Wang W. Conversion of peripheral CD4(+)CD25(-) T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by IFN-gamma in patients with guillain-barre syndrome. *J Neuroimmunol* 2009;217:80-84.
50. Pritchard J, Makowska A, Gregson NA, Hayday AC, Hughes RA. Reduced circulating CD4+CD25+ cell populations in guillain-barre syndrome. *J Neuroimmunol* 2007;183:232-238.
51. Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 2002;125:2591-2625.
52. Braun PE, Frail DE, Latov N. Myelin-associated glycoprotein is the antigen for a monoclonal IgM in polyneuropathy. *J Neurochem* 1982;39:1261-1265.
53. Yuki N, Kuwabara S. Axonal guillain-barre syndrome: Carbohydrate mimicry and pathophysiology. *J Peripher Nerv Syst* 2007;12:238-249.
54. Plomp JJ, Molenaar PC, O'Hanlon GM, et al. Miller fisher anti-GQ1b antibodies: Alpha-latrotoxin-like effects on motor end plates. *Ann Neurol* 1999;45:189-199.
55. Kusunoki S, Hitoshi S, Kaida K, Murayama S, Kanazawa I. Degeneration of rabbit sensory neurons induced by passive transfer of anti-GD1b antiserum. *Neurosci Lett* 1999;273:33-36.
56. Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:797-804.
57. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001;7:365-368.
58. Klooster R, Plomp JJ, Huijbers MG, et al. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain* 2012;135:1081-1101.
59. Diaz-Manera J, Martinez-Hernandez E, Querol L, et al. Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology* 2012;78:189-193.
60. Meyer zu Horste G, Hu W, Hartung HP, Lehmann HC, Kieseier BC. The immunocompetence of schwann cells. *Muscle Nerve* 2008;37:3-13.

61. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-384.
62. Li M, Zhou Y, Feng G, Su SB. The critical role of toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune diseases. *Curr Mol Med* 2009;9:365-374.
63. Goethals S, Ydens E, Timmerman V, Janssens S. Toll-like receptor expression in the peripheral nerve. *Glia* 2010;58:1701-1709.
64. Morton PD, Johnstone JT, Ramos AY, Liebl DJ, Bunge MB, Bethea JR. Nuclear factor-kappaB activation in schwann cells regulates regeneration and remyelination. *Glia* 2012;60:639-650.
65. Qin Y, Hua M, Duan Y, et al. TNF-alpha expression in schwann cells is induced by LPS and NF-kappaB-dependent pathways. *Neurochem Res* 2012;37:722-731.
66. Murata K, Dalakas MC. Expression of the co-stimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28 and their mRNAs in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 2000;123 (Pt 8):1660-1666.
67. Bergsteinsdottir K, Kingston A, Mirsky R, Jessen KR. Rat schwann cells produce interleukin-1. *J Neuroimmunol* 1991;34:15-23.
68. Murwani R, Hodgkinson S, Armati P. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 mRNA expression in neonatal lewis rat schwann cells and a neonatal rat schwann cell line following interferon gamma stimulation. *J Neuroimmunol* 1996;71:65-71.
69. Scherer SS, Kamholz J, Jakowlew SB. Axons modulate the expression of transforming growth factor-betas in schwann cells. *Glia* 1993;8:265-276.
70. Constable AL, Armati PJ, Toyka KV, Hartung HP. Production of prostanoids by lewis rat schwann cells in vitro. *Brain Res* 1994;635:75-80.
71. Constable AL, Armati PJ, Hartung HP. DMSO induction of the leukotriene LTC4 by lewis rat schwann cells. *J Neurol Sci* 1999;162:120-126.
72. Wohlleben G, Ibrahim SM, Schmidt J, Toyka KV, Hartung HP, Gold R. Regulation of fas and FasL expression on rat schwann cells. *Glia* 2000;30:373-381.
73. Bonetti B, Valdo P, Ossi G, et al. T-cell cytotoxicity of human schwann cells: TNFalpha promotes fasL-mediated apoptosis and IFN gamma perforin-mediated lysis. *Glia* 2003;43:141-148.
74. Lehmann HC, Meyer Zu Horste G, Kieseier BC, Hartung HP. Pathogenesis and treatment of immune-mediated neuropathies. *Ther Adv Neurol Disord* 2009;2:261-281.
75. Yuki N, Hartung HP. Guillain-barre syndrome. *N Engl J Med* 2012;366:2294-2304.
76. Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for guillain-barre syndrome. *Ann Neurol* 1990;27 Suppl:S21-4.

77. van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC. Clinical features, pathogenesis, and treatment of guillain-barre syndrome. *Lancet Neurol* 2008;7:939-950.
78. Hughes RA, Cornblath DR. Guillain-barre syndrome. *Lancet* 2005;366:1653-1666.
79. Chio A, Cocito D, Leone M, et al. Guillain-barre syndrome: A prospective, population-based incidence and outcome survey. *Neurology* 2003;60:1146-1150.
80. Rees JH, Thompson RD, Smeeton NC, Hughes RA. Epidemiological study of guillain-barre syndrome in south east england. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:74-77.
81. Van Koningsveld R, Schmitz PI, Ang CW, et al. Infections and course of disease in mild forms of guillain-barre syndrome. *Neurology* 2002;58:610-614.
82. Bogliun G, Beghi E, Italian GBS Registry Study Group. Incidence and clinical features of acute inflammatory polyradiculoneuropathy in lombardy, italy, 1996. *Acta Neurol Scand* 2004;110:100-106.
83. Sedano MJ, Calleja J, Canga E, Berciano J. Guillain-barre syndrome in cantabria, spain. an epidemiological and clinical study. *Acta Neurol Scand* 1994;89:287-292.
84. Ho TW, Mishu B, Li CY, et al. Guillain-barre syndrome in northern china. relationship to campylobacter jejuni infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain* 1995;118 (Pt 3):597-605.
85. Alsheklee A, Hussain Z, Sultan B, Katirji B. Guillain-barre syndrome: Incidence and mortality rates in US hospitals. *Neurology* 2008;70:1608-1613.
86. Blaser MJ, Olivares A, Taylor DN, Cornblath DR, McKhann GM. Campylobacter serology in patients with chinese paralytic syndrome. *Lancet* 1991;338:308.
87. Hadden RD, Karch H, Hartung HP, et al. Preceding infections, immune factors, and outcome in guillain-barre syndrome. *Neurology* 2001;56:758-765.
88. Langmuir AD, Bregman DJ, Kurland LT, Nathanson N, Victor M. An epidemiologic and clinical evaluation of guillain-barre syndrome reported in association with the administration of swine influenza vaccines. *Am J Epidemiol* 1984;119:841-879.
89. Zochodne DW. Autonomic involvement in guillain-barre syndrome: A review. *Muscle Nerve* 1994;17:1145-1155.
90. van Koningsveld R, Steyerberg EW, Hughes RA, Swan AV, van Doorn PA, Jacobs BC. A clinical prognostic scoring system for guillain-barre syndrome. *Lancet Neurol* 2007;6:589-594.
91. Hughes RA, Swan AV, van Doorn PA. Intravenous immunoglobulin for guillain-barre syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD002063.
92. Raphael JC, Chevret S, Hughes RA, Annane D. Plasma exchange for guillain-barre syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;7:CD001798.
93. van Doorn PA, Kuitwaard K, Walgaard C, van Koningsveld R, Ruts L, Jacobs BC. IVIG treatment and prognosis in guillain-barre syndrome. *J Clin Immunol* 2010;30 Suppl 1:S74-8.

94. Blanchard O, Genge A. Treatment of severe AIDPN with methylprednisolone, a series of 8 cases. April 2013, 2013; American Academy of Neurology Annual Meeting, San Diego, CA.
95. Hughes RA, van Doorn PA. Corticosteroids for guillain-barre syndrome. Cochrane Database Syst Rev 2012;8:CD001446.
96. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T. Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following campylobacter enteritis. Neurology 1990;40:1900-1902.
97. Gregson NA, Jones D, Thomas PK, Willison HJ. Acute motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. J Neurol 1991;238:447-451.
98. Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. Brain 2002;125:2591-2625.
99. Hiraga A, Mori M, Ogawara K, et al. Recovery patterns and long term prognosis for axonal guillain-barre syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005;76:719-722.
100. Chowdhury D, Arora A. Axonal guillain-barre syndrome: A critical review. Acta Neurol Scand 2001;103:267-277.
101. FISHER M. An unusual variant of acute idiopathic polyneuritis (syndrome of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia). N Engl J Med 1956;255:57-65.
102. Lo YL. Clinical and immunological spectrum of the miller fisher syndrome. Muscle Nerve 2007;36:615-627.
103. Yuki N. Fisher syndrome and bickerstaff brainstem encephalitis (fisher-bickerstaff syndrome). J Neuroimmunol 2009;215:1-9.
104. Oh SJ, LaGanke C, Claussen GC. Sensory guillain-barre syndrome. Neurology 2001;56:82-86.
105. Miralles F, Montero J, Rene R, Martinez Matos JA. Pure sensory guillain-barre syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1992;55:411-412.
106. Dawson DM, Samuels MA, Morris J. Sensory form of acute polyneuritis. Neurology 1988;38:1728-1731.
107. Lee SS, Lee SH. Does sensory guillain-barre syndrome exist without any abnormalities in motor nerve conduction? Neurology 2006;66:947-948.
108. RICHTER RB. The ataxic form of polyradiculoneuritis (landry-guillain-barre syndrome). clinical and pathologic observations. J Neuropathol Exp Neurol 1962;21:171-184.
109. Mori M, Kuwabara S, Koga M, et al. IgG anti-GQ1b positive acute ataxia without ophthalmoplegia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999;67:668-670.
110. Yuki N, Susuki K, Hirata K. Ataxic guillain-barre syndrome with anti-GQ1b antibody: Relation to miller fisher syndrome. Neurology 2000;54:1851-1853.

111. Nagashima T, Koga M, Odaka M, Hirata K, Yuki N. Clinical correlates of serum anti-GT1a IgG antibodies. *J Neurol Sci* 2004;219:139-145.
112. Nagashima T, Koga M, Odaka M, Hirata K, Yuki N. Continuous spectrum of pharyngeal-cervical-brachial variant of guillain-barre syndrome. *Arch Neurol* 2007;64:1519-1523.
113. Ropper AH. Unusual clinical variants and signs in guillain-barre syndrome. *Arch Neurol* 1986;43:1150-1152.
114. Mahdi-Rogers M, Hughes RA. Epidemiology of chronic inflammatory neuropathies in south-east england. *Eur J Neurol* 2013.
115. Dyck PJ, Lais AC, Ohta M, Bastron JA, Okazaki H, Groover RV. Chronic inflammatory polyradiculoneuropathy. *Mayo Clin Proc* 1975;50:621-637.
116. Prineas JW, McLeod JG. Chronic relapsing polyneuritis. *J Neurol Sci* 1976;27:427-458.
117. Viala K, Maisonobe T, Stojkovic T, et al. A current view of the diagnosis, clinical variants, response to treatment and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:50-56.
118. Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European federation of neurological societies/peripheral nerve society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint task force of the european federation of neurological societies and the peripheral nerve society--first revision. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:1-9.
119. Querol L, Rojas-Garcia R, Casanovas C, et al. Long-term outcome in CIDP patients treated with IVIg: A retrospective study. *Muscle Nerve* 2013.
120. Lewis RA, Sumner AJ, Brown MJ, Asbury AK. Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology* 1982;32:958-964.
121. Katz JS, Saperstein DS, Gronseth G, Amato AA, Barohn RJ. Distal acquired demyelinating symmetric neuropathy. *Neurology* 2000;54:615-620.
122. Mehndiratta MM, Hughes RA. Corticosteroids for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;(1):CD002062.
123. Hughes RA, Bouche P, Cornblath DR, et al. European federation of neurological societies/peripheral nerve society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint task force of the european federation of neurological societies and the peripheral nerve society. *Eur J Neurol* 2006;13:326-332.
124. Eftimov F, Winer JB, Vermeulen M, de Haan R, van Schaik IN. Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(1):CD001797.
125. Kuitwaard K, van Doorn PA. Newer therapeutic options for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Drugs* 2009;69:987-1001.

126. Eftimov F, Vermeulen M, van Doorn PA, et al. Long-term remission of CIDP after pulsed dexamethasone or short-term prednisolone treatment. *Neurology* 2012;78:1079-1084.
127. Hughes RA, Donofrio P, Bril V, et al. Intravenous immune globulin (10% caprylate-chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): A randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2008;7:136-144.
128. Dyck PJ, Litchy WJ, Kratz KM, et al. A plasma exchange versus immune globulin infusion trial in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol* 1994;36:838-845.
129. Mehndiratta MM, Hughes RA, Agarwal P. Plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(3):CD003906.
130. Mahdi-Rogers M, Swan AV, van Doorn PA, Hughes RA. Immunomodulatory treatment other than corticosteroids, immunoglobulin and plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(11):CD003280.
131. Benedetti L, Franciotta D, Beronio A, et al. Rituximab efficacy in CIDP associated with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Muscle Nerve* 2008;38:1076-1077.
132. Munch C, Anagnostou P, Meyer R, Haas J. Rituximab in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with diabetes mellitus. *J Neurol Sci* 2007;256:100-102.
133. Benedetti L, Briani C, Franciotta D, et al. Rituximab in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: A report of 13 cases and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:306-308.
134. Gladstone DE, Prestrud AA, Brannagan TH,3rd. High-dose cyclophosphamide results in long-term disease remission with restoration of a normal quality of life in patients with severe refractory chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2005;10:11-16.
135. Brannagan TH,3rd, Pradhan A, Heiman-Patterson T, et al. High-dose cyclophosphamide without stem-cell rescue for refractory CIDP. *Neurology* 2002;58:1856-1858.
136. Gorson KC, van Schaik IN, Merkies IS, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy disease activity status: Recommendations for clinical research standards and use in clinical practice. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:326-333.
137. Choudhary PP, Hughes RA. Long-term treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy with plasma exchange or intravenous immunoglobulin. *QJM* 1995;88:493-502.
138. Kelly JJ,Jr, Kyle RA, O'Brien PC, Dyck PJ. Prevalence of monoclonal protein in peripheral neuropathy. *Neurology* 1981;31:1480-1483.
139. Nobile-Orazio E. Update on neuropathies associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance (2008-2010). *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:302-306.

140. Rajabally YA. Neuropathy and paraproteins: Review of a complex association. *Eur J Neurol* 2011;18:1291-1298.

141. Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European federation of neurological societies/peripheral nerve society guideline on management of paraproteinemic demyelinating neuropathies. report of a joint task force of the european federation of neurological societies and the peripheral nerve society--first revision. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:185-195.

142. Van den Bergh PY, Hadden RD, Bouche P, et al. European federation of neurological societies/peripheral nerve society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint task force of the european federation of neurological societies and the peripheral nerve society - first revision. *Eur J Neurol* 2010;17:356-363.

143. Willison HJ, O'Leary CP, Veitch J, et al. The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 2001;124:1968-1977.

144. Dispenzieri A. POEMS syndrome: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2011;86:591-601.

145. Lunn MP, Nobile-Orazio E. Immunotherapy for IgM anti-myelin-associated glycoprotein paraprotein-associated peripheral neuropathies. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(2):CD002827.

146. Renaud S, Fuhr P, Gregor M, et al. High-dose rituximab and anti-MAG-associated polyneuropathy. *Neurology* 2006;66:742-744.

147. Levine TD, Pestronk A. IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab. *Neurology* 1999;52:1701-1704.

148. Gruson B, Ghomari K, Beaumont M, et al. Long-term response to rituximab and fludarabine combination in IgM anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2011;16:180-185.

149. Zara G, Zambello R, Ermani M. Neurophysiological and clinical responses to rituximab in patients with anti-MAG polyneuropathy. *Clin Neurophysiol* 2011;122:2518-2522.

150. Dalakas MC, Rakocevic G, Salajegheh M, et al. Placebo-controlled trial of rituximab in IgM anti-myelin-associated glycoprotein antibody demyelinating neuropathy. *Ann Neurol* 2009;65:286-293.

151. Leger JM, Viala K, Nicolas G, et al. Placebo-controlled trial of rituximab in IgM anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *Neurology* 2013;80:2217-2225.

152. Rowland LP. Progressive muscular atrophy and other lower motor neuron syndromes of adults. *Muscle Nerve* 2010;41:161-165.

153. Vlam L, van der Pol WL, Cats EA, et al. Multifocal motor neuropathy: Diagnosis, pathogenesis and treatment strategies. *Nat Rev Neurol* 2011;8:48-58.

154. Pestronk A, Cornblath DR, Ilyas AA, et al. A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 1988;24:73-78.
155. Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European federation of neurological societies/peripheral nerve society guideline on management of multifocal motor neuropathy. report of a joint task force of the european federation of neurological societies and the peripheral nerve society--first revision. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:295-301.
156. Katz JS, Barohn RJ, Kojan S, et al. Axonal multifocal motor neuropathy without conduction block or other features of demyelination. *Neurology* 2002;58:615-620.
157. Pakiam AS, Parry GJ. Multifocal motor neuropathy without overt conduction block. *Muscle Nerve* 1998;21:243-245.
158. Eftimov F, Van Schaik IN. Immunotherapy of multifocal motor neuropathy. *Expert Opin Biol Ther* 2011;11:329-342.
159. Umapathi T, Hughes RA, Nobile-Orazio E, Leger JM. Immunosuppressant and immunomodulatory treatments for multifocal motor neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;4:CD003217.
160. Van den Berg LH, Lokhorst H, Wokke JH. Pulsed high-dose dexamethasone is not effective in patients with multifocal motor neuropathy. *Neurology* 1997;48:1135.
161. Cats EA, van der Pol WL, Piepers S, et al. Correlates of outcome and response to IVIg in 88 patients with multifocal motor neuropathy. *Neurology* 2010;75:818-825.
162. Nobile-Orazio E, Cappellari A, Meucci N, et al. Multifocal motor neuropathy: Clinical and immunological features and response to IVIg in relation to the presence and degree of motor conduction block. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:761-766.
163. HAYMAKER WE, KERNOHAN JW. The landry-guillain-barre syndrome; a clinicopathologic report of 50 fatal cases and a critique of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1949;28:59-141.
164. Oh SJ. Inflammatory demyelinating neuropathy. In: *Color Atlas of Nerve Biopsy Pathology*. Florida, USA: CRC Press, 2002, .
165. Asbury AK, Arnason BG, Adams RD. The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. its role in pathogenesis. *Medicine (Baltimore)* 1969;48:173-215.
166. Prineas JW. Acute idiopathic polyneuritis. an electron microscope study. *Lab Invest* 1972;26:133-147.
167. Hughes R, Atkinson P, Coates P, Hall S, Leibowitz S. Sural nerve biopsies in guillain-barre syndrome: Axonal degeneration and macrophage-associated demyelination and absence of cytomegalovirus genome. *Muscle Nerve* 1992;15:568-575.
168. Brechenmacher C, Vital C, Deminiere C, et al. Guillain-barre syndrome: An ultrastructural study of peripheral nerve in 65 patients. *Clin Neuropathol* 1987;6:19-24.

169. Paparounas K, O'Hanlon GM, O'Leary CP, Rowan EG, Willison HJ. Anti-ganglioside antibodies can bind peripheral nerve nodes of ranvier and activate the complement cascade without inducing acute conduction block in vitro. *Brain* 1999;122 (Pt 5):807-816.
170. Uncini A, Santoro M, Corbo M, Lugaresi A, Latov N. Conduction abnormalities induced by sera of patients with multifocal motor neuropathy and anti-GM1 antibodies. *Muscle Nerve* 1993;16:610-615.
171. Hafer-Macko C, Hsieh ST, Li CY, et al. Acute motor axonal neuropathy: An antibody-mediated attack on axolemma. *Ann Neurol* 1996;40:635-644.
172. Santoro M, Uncini A, Corbo M, et al. Experimental conduction block induced by serum from a patient with anti-GM1 antibodies. *Ann Neurol* 1992;31:385-390.
173. Berciano J, Figols J, Garcia A, et al. Fulminant guillain-barre syndrome with universal inexcitability of peripheral nerves: A clinicopathological study. *Muscle Nerve* 1997;20:846-857.
174. Berciano J, Garcia A, Figols J, Munoz R, Berciano MT, Lafarga M. Perineurium contributes to axonal damage in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2000;55:552-559.
175. Pan CL, Tseng TJ, Lin YH, Chiang MC, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous innervation in guillain-barre syndrome: Pathology and clinical correlations. *Brain* 2003;126:386-397.
176. Ruts L, van Doorn PA, Lombardi R, et al. Unmyelinated and myelinated skin nerve damage in guillain-barre syndrome: Correlation with pain and recovery. *Pain* 2012;153:399-409.
177. Gilbert M, Karwaski MF, Bernatchez S, et al. The genetic bases for the variation in the lipooligosaccharide of the mucosal pathogen, campylobacter jejuni. biosynthesis of sialylated ganglioside mimics in the core oligosaccharide. *J Biol Chem* 2002;277:327-337.
178. Kuijff ML, Samsom JN, van Rijs W, et al. TLR4-mediated sensing of campylobacter jejuni by dendritic cells is determined by sialylation. *J Immunol* 2010;185:748-755.
179. Nyati KK, Prasad KN, Verma A, et al. Association of TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with guillain-barre syndrome in northern indian population. *J Neuroimmunol* 2010;218:116-119.
180. Illa I, Ortiz N, Gallard E, Juarez C, Grau JM, Dalakas MC. Acute axonal guillain-barre syndrome with IgG antibodies against motor axons following parenteral gangliosides. *Ann Neurol* 1995;38:218-224.
181. Griffin JW, Li CY, Macko C, et al. Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the guillain-barre syndrome. *J Neurocytol* 1996;25:33-51.
182. Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, et al. Immune attack on the schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 1996;39:625-635.
183. Ogawa-Goto K, Funamoto N, Ohta Y, Abe T, Nagashima K. Myelin gangliosides of human peripheral nervous system: An enrichment of GM1 in the motor nerve myelin isolated from cauda equina. *J Neurochem* 1992;59:1844-1849.

184. Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Kanazawa I. Ganglioside composition of the human cranial nerves, with special reference to pathophysiology of miller fisher syndrome. *Brain Res* 1997;745:32-36.
185. Kusunoki S, Chiba A, Tai T, Kanazawa I. Localization of GM1 and GD1b antigens in the human peripheral nervous system. *Muscle Nerve* 1993;16:752-756.
186. Rojas-Garcia R, Gallardo E, Povedano M, et al. Antibodies against disialosyl and terminal NeuNAc(alpha2-3)gal ganglioside epitopes in acute relapsing sensory ataxic neuropathy. *J Neurol* 2008;255:764-766.
187. Rojas-Garcia R, Gallardo E, De Luna N, et al. Bulbar involvement in patients with antiganglioside antibodies against NeuNAc(alpha2-3)gal. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:623-628.
188. Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in guillain-barre syndrome and fisher syndrome: Mini-review. *J Neuroimmunol* 2010;223:5-12.
189. Halstead SK, Zitman FM, Humphreys PD, et al. Eculizumab prevents anti-ganglioside antibody-mediated neuropathy in a murine model. *Brain* 2008;131:1197-1208.
190. Kusunoki S, Hitoshi S, Kaida K, Arita M, Kanazawa I. Monospecific anti-GD1b IgG is required to induce rabbit ataxic neuropathy. *Ann Neurol* 1999;45:400-403.
191. Lopez PH, Zhang G, Zhang J, et al. Passive transfer of IgG anti-GM1 antibodies impairs peripheral nerve repair. *J Neurosci* 2010;30:9533-9541.
192. Ang CW, Endtz HP, Jacobs BC, et al. *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides from guillain-barre syndrome patients induce IgG anti-GM1 antibodies in rabbits. *J Neuroimmunol* 2000;104:133-138.
193. Dalakas MC, Engel WK. Immunoglobulin and complement deposits in nerves of patients with chronic relapsing polyneuropathy. *Arch Neurol* 1980;37:637-640.
194. Cifuentes-Diaz C, Dubourg O, Irinopoulou T, et al. Nodes of ranvier and paranodes in chronic acquired neuropathies. *PLoS One* 2011;6:e14533.
195. Doppler K, Werner C, Sommer C. Dysruption of nodal architecture in skin biopsies of patients with demyelinating neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 2013;(in press).
196. Saporta MA, Katona I, Lewis RA, Masse S, Shy ME, Li J. Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibres in charcot-marie-tooth disease type 1A. *Brain* 2009;132:3263-3273.
197. Pollard JD, Armati PJ. CIDP - the relevance of recent advances in schwann cell/axonal neurobiology. *J Peripher Nerv Syst* 2011;16:15-23.
198. Hughes RA, Allen D, Makowska A, Gregson NA. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2006;11:30-46.

199. Griffin JW, Stoll G, Li CY, Tyor W, Cornblath DR. Macrophage responses in inflammatory demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 1990;27 Suppl:S64-8.
200. Khalili-Shirazi A, Gregson NA, Londei M, Summers L, Hughes RA. The distribution of CD1 molecules in inflammatory neuropathy. *J Neurol Sci* 1998;158:154-163.
201. Bosboom WM, Van den Berg LH, Mollee I, et al. Sural nerve T-cell receptor vbeta gene utilization in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and vasculitic neuropathy. *Neurology* 2001;56:74-81.
202. Schmidt B, Toyka KV, Kiefer R, Full J, Hartung HP, Pollard J. Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in guillain-barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Muscle Nerve* 1996;19:474-487.
203. Leppert D, Hughes P, Huber S, et al. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology* 1999;53:62-70.
204. Kieseier BC, Tani M, Mahad D, et al. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: A central role for IP-10. *Brain* 2002;125:823-834.
205. Chi LJ, Xu WH, Zhang ZW, Huang HT, Zhang LM, Zhou J. Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:345-356.
206. Mausberg AK, Dorok M, Stettner M, et al. Recovery of the T-cell repertoire in CIDP by IV immunoglobulins. *Neurology* 2013;80:296-303.
207. Sanvito L, Makowska A, Mahdi-Rogers M, et al. Humoral and cellular immune responses to myelin protein peptides in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:333-338.
208. Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, et al. Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells. *Blood* 2013;121:1595-1603.
209. Lindenlaub T, Sommer C. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol* 2003;105:593-602.
210. Dalakas MC, Medscape. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat Rev Neurol* 2011.
211. Tackenberg B, Jelcic I, Baerenwaldt A, et al. Impaired inhibitory fcgamma receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4788-4792.
212. Yan WX, Taylor J, Andrias-Kauba S, Pollard JD. Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Ann Neurol* 2000;47:765-775.
213. Yan WX, Archelos JJ, Hartung HP, Pollard JD. PO protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol* 2001;50:286-292.

214. Gabriel CM, Gregson NA, Hughes RA. Anti-PMP22 antibodies in patients with inflammatory neuropathy. *J Neuroimmunol* 2000;104:139-146.
215. Ritz MF, Lechner-Scott J, Scott RJ, et al. Characterisation of autoantibodies to peripheral myelin protein 22 in patients with hereditary and acquired neuropathies. *J Neuroimmunol* 2000;104:155-163.
216. Kwa MS, van Schaik IN, Brand A, Baas F, Vermeulen M. Investigation of serum response to PMP22, connexin 32 and P(0) in inflammatory neuropathies. *J Neuroimmunol* 2001;116:220-225.
217. Iijima M, Koike H, Katsuno M, Sobue G. Polymorphism of transient axonal glycoprotein-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2011;16 Suppl 1:52-55.
218. Hahn AF. Experimental allergic neuritis (EAN) as a model for the immune-mediated demyelinating neuropathies. *Rev Neurol (Paris)* 1996;152:328-332.
219. Zweiman B, Moskovitz AR, Rostami A, Lisak RP, Pleasure DE, Brown MJ. Antibodies to P2 and P1 myelin antigens in experimental allergic neuritis and allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1982;2:331-336.
220. Mizisin AP, Wiley CA, Hughes RA, Powell HC. Peripheral nerve demyelination in rabbits after inoculation with Freund's complete adjuvant alone or in combination with lipid haptens. *J Neuroimmunol* 1987;16:381-395.
221. Zweiman B, Rostami A, Lisak RP, Moskovitz AR, Pleasure DE. Immune reactions to P2 protein in human inflammatory demyelinating neuropathies. *Neurology* 1983;33:234-237.
222. Vedeler CA, Matre R, Nyland H. Class and IgG subclass distribution of antibodies against peripheral nerve myelin in sera from patients with inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Acta Neurol Scand* 1988;78:401-407.
223. van Doorn PA, Brand A, Vermeulen M. Clinical significance of antibodies against peripheral nerve tissue in inflammatory polyneuropathy. *Neurology* 1987;37:1798-1802.
224. Archelos JJ, Roggenbuck K, Schneider-Schaulies J, Toyka KV, Hartung HP. Detection and quantification of antibodies to the extracellular domain of P0 during experimental allergic neuritis. *J Neurol Sci* 1993;117:197-205.
225. Melendez-Vasquez CV, Gregson NA. Characterization and partial purification of a novel 36 kDa peripheral myelin protein recognized by the sera of patients with neurological disorders. *J Neuroimmunol* 1998;91:10-18.
226. Kwa MS, van Schaik IN, De Jonge RR, et al. Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies. *Brain* 2003;126:361-375.
227. Inglis HR, Csurhes PA, McCombe PA. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:419-422.

228. van Schaik IN, Vermeulen M, van Doorn PA, Brand A. Anti-GM1 antibodies in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) treated with intravenous immunoglobulin (IVIg). *J Neuroimmunol* 1994;54:109-115.
229. Yuki N, Tagawa Y, Handa S. Autoantibodies to peripheral nerve glycosphingolipids SPG, SLPG, and SGPG in guillain-barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 1996;70:1-6.
230. Fredman P, Vedeler CA, Nyland H, Aarli JA, Svennerholm L. Antibodies in sera from patients with inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy react with ganglioside LM1 and sulphatide of peripheral nerve myelin. *J Neurol* 1991;238:75-79.
231. Kuwahara M, Suzuki S, Takada K, Kusunoki S. Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in guillain-barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 2011.
232. Kuwahara M, Suzuki H, Samukawa M, Hamada Y, Takada K, Kusunoki S. Clinical features of CIDP with LM1-associated antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:573-575.
233. Connolly AM, Pestronk A, Trotter JL, Feldman EL, Cornblath DR, Olney RK. High-titer selective serum anti-beta-tubulin antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 1993;43:557-562.
234. Connolly AM, Pestronk A. Anti-tubulin autoantibodies in acquired demyelinating polyneuropathies. *J Infect Dis* 1997;176 Suppl 2:S157-9.
235. Manfredini E, Nobile-Orazio E, Allaria S, Scarlato G. Anti-alpha- and beta-tubulin IgM antibodies in dysimmune neuropathies. *J Neurol Sci* 1995;133:79-84.
236. van Schaik IN, Vermeulen M, van Doorn PA, Brand A. Anti-beta-tubulin antibodies have no diagnostic value in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol* 1995;242:599-603.
237. Tagawa Y, Yuki N, Hirata K. The 301 to 314 amino acid residue of beta-tubulin is not a target epitope for serum IgM antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Sci* 1999;163:44-46.
238. Lonigro A, Devaux JJ. Disruption of neurofascin and gliomedin at nodes of ranvier precedes demyelination in experimental allergic neuritis. *Brain* 2009;132:260-273.
239. Mathey E, Yan W, Yuki N, Ji Q, Yiannikas C, Pollard J. Antineurofascin antibodies are present in patients with peripheral demyelinating neuropathies and mediate changes in nerve conduction in animals. *J Peripher Nerv Syst* 2010;15:288-289.
240. Ng JK, Malotka J, Kawakami N, et al. Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology* 2012;79:2241-2248.
241. Pruss H, Schwab JM, Derst C, Gortzen A, Veh RW. Neurofascin as target of autoantibodies in guillain-barre syndrome. *Brain* 2011;134:e173; author reply e174.

242. Devaux JJ, Odaka M, Yuki N. Nodal proteins are target antigens in guillain-barre syndrome. *J Peripher Nerv Syst* 2012;17:62-71.