

CANALOPATÍAS AUTOINMUNES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

TESIS DOCTORAL

Patricia Pozo Rosich

Dirigida por:

Dr. Francesc Graus

A mis padres, por su amor, apoyo emocional constante y apuesta, sin fronteras, por nuestra educación: “el NO siempre se tiene”.

A mi hermano Oliver, mi mejor amigo y cómplice.

A Jérôme, por toda su paciencia y amor.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que se expone en esta Tesis Doctoral fue realizado entre los años 2000-2004, entre la Universidad de Barcelona – Hospital Clínic – y la Universidad de Oxford – Weatherall Institute of Molecular Medicine del Hospital John Radcliffe – en Inglaterra.

A mi tutor y profesor el Dr. Francesc Graus. No sólo me enseñó las principales características que debe tener un neurólogo clínico, sino que además me inculcó los principios fundamentales que debe tener un investigador. Es riguroso con su trabajo, metódico y enseña como aplicar correctamente el método científico en cualquiera de las hipótesis de trabajo que se quieran estudiar. Es trabajador, y enseña sobretodo con el ejemplo. Le agradezco la gran confianza que siempre ha depositado en mi, especialmente cuando por primera vez le pedí que quería aprender a su lado a ser una médico investigadora.

A la Profesora Angela Vincent del Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital en la Universidad de Oxford en Inglaterra y su equipo (Dra. Beth Lang y Linda Clover) por su paciencia al introducirme en las técnicas de laboratorio específicas para realizar este tipo de experimentos. Me dieron la gran oportunidad de aprender a su lado, y a ellas les agradezco el altruismo científico que derrochan.

Al Dr. Albert Saiz, le agradezco su colaboración para corregir todas aquellas ideas que surgían, siendo un referente en todos aquellos trabajos que hemos realizado.

A Mercè Bonastre, por todo su cariño al intentar hacerme parte del equipo de laboratorio. Sin su ayuda y experiencia, este trabajo tampoco hubiese sido una realidad.

No puedo dejar de mencionar al Dr. Josep Dalmau y a la Dra. Myrna R. Rosenfeld, con ellos descubrí el mundo paraneoplásico estadounidense. Son, sin lugar a dudas, mi familia adoptiva en Estados Unidos.

El capítulo final de mis agradecimientos va dirigido a los pacientes y sus familias, sin cuya confianza, nuestro trabajo no podría ser una realidad. Nuestra investigación, energía y motivación está dirigida hacia la mejor comprensión de las enfermedades que sufren para poder intentar llegar a conclusiones que faciliten el hallazgo de nuevos tratamientos.

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN	17
I. CANALOPATÍAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	19
1. Canales iónicos.....	19
a. Canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)	26
b. Canales de calcio dependientes de voltaje (Cav)	32
c. Canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)	41
2. Concepto de canalopatía.....	45
3. Tipos de canalopatías.....	46
a. Canalopatías de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)	47
b. Canalopatías de los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav)	54
c. Canalopatías de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)	60
II. AUTOINMUNIDAD Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	65
1. Trastornos del SNC con anticuerpos frente a un autoantígeno conocido	68
a. Síndromes paraneoplásicos neurológicos	68
b. Ataxia cerebelosa y enteropatía al gluten	81
c. Encefalitis de Rasmussen y anticuerpos contra los receptores ionotrópicos del glutamato tipo 3 (RGlu3)	87
d. Síndromes del sistema nervioso central y anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD)	89
e. Síndromes del sistema nervioso central y anticuerpos anti-antifosfina	94
2. Trastornos del SNC con anticuerpos frente a un autoantígeno desconocido.....	97

a.	<i>Enfermedad del sistema nervioso central post-estreptocócica</i>	97
b.	<i>Enfermedad neurológica y el virus humano linfotrópico-T</i>	105
III.	SÍNDROMES NEUROLÓGICOS QUE PODRÍAN CONSIDERARSE CANALOPATÍAS AUTOINMUNES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	109
1.	<i>Canalopatía autoinmune</i>	109
2.	<i>Canalopatías autoinmunes del sistema nervioso periférico</i>	110
a.	<i>Miastenia gravis (MG)</i>	110
b.	<i>Ganglioneuropatía autónoma autoinmune</i>	113
c.	<i>Síndrome de Eaton-Lambert (SMEL)</i>	114
d.	<i>Neuromiotonía o síndrome de Isaac</i>	117
3.	<i>Canalopatías autoinmunes del sistema nervioso central</i>	119
a.	<i>Degeneración cerebelosa paraneoplásica subaguda (DCP)</i>	119
b.	<i>Síndrome de Morvan</i>	123
c.	<i>Encefalitis límbica</i>	125
B.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	131
C.	OBJETIVOS	133
D.	MÉTODOS DE ESTUDIO	135
I.	PACIENTES	135
II.	MÉTODOS	138
E.	RESULTADOS / DISCUSIÓN	143
F.	DISCUSIÓN GENERAL	159

G. CONCLUSIONES	175
H. BIBLIOGRAFÍA.....	177
I. ANEXOS.....	213
<i>Trabajo 1: Estudio de la incidencia de los canales de calcio tipo P/Q en la degeneración cerebelosa paraneoplásica asociada al cáncer de pulmon.....</i>	<i>215</i>
<i>Trabajo 2: Estudio de los anticuerpos contra canales de potasio presentes en pacientes con una encefalitis límbica</i>	<i>221</i>
<i>Trabajo 3: El uso de un anticuerpo nuclear anti-glial como probable marcador del cáncer de pulmón y como ayuda para el diagnóstico de los síndromes neurológicos paraneoplásicos</i>	<i>227</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Canal de sodio. Organización transmembrana de las subunidades de un canal de sodio	29
Figura 2.	Estructura y subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje	33
Figura 3.	Representación esquemática de una subunidad del canal Kv1.1	42
Figura 4.	Estructura de diferentes canales de potasio dependientes de voltaje	43
Figura 5.	Trastornos alélicos del canal de calcio tipo Cav2.1 (según Cannon, 2006)	58
Figura 6.	Diagrama de flujos mostrando el nivel de evidencia diagnóstica del síndrome neurológico según los criterios definidos por el panel de expertos (según Graus et al., 2004)	75
Figura 7.	Modelo inmunopatológico en los síndromes paraneoplásicos neurológicos	76
Figura 8.	Diagrama que muestra las concentraciones de anticuerpos anti-GAD (U/mL)	90
Figura 9.	Niveles de anticuerpos contra canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) en pacientes con degeneración cerebelosa paraneoplásica y cáncer de pulmón	145
Figura 10.	Núcleos de la glía de Bergmann en la capa de células de Purkinje	152
Figura 11.	Sección congelada de hipocampo de rata fijada con paraformaldehído, con doble marcaje: IgG AGNA biotinilado (rojo) y anticuerpo NeuN (verde)	153
Figura 12.	Secciones con parafina de cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) que han inmunorreaccionado con IgG AGNA biotinilado	154

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	<i>Tipos de canales de sodio según subunidad α y su localización en el sistema nervioso humano</i>	31
Tabla 2.	<i>Nomenclatura de genes clonados de subunidades canales de Ca^{2+} humanos</i>	35
Tabla 3.	<i>Funciones fisiológicas, localización y farmacología de los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav)</i>	37
Tabla 4.	<i>Tipos de canales de potasio: nomenclatura y localización en el SNC</i>	44
Tabla 5.	<i>Trastornos hereditarios asociados a los canales de sodio dependientes de voltaje</i>	49
Tabla 6.	<i>Tipos y localización de las canalopatías de los canales de calcio dependientes de voltaje descritas en humanos</i>	55
Tabla 7.	<i>Canalopatías del SNC de los canales de potasio dependientes de voltaje</i>	61
Tabla 8.	<i>Síndromes epilépticos relacionados con mutaciones de canales iónicos</i>	63
Tabla 9.	<i>Autoanticuerpos asociados con trastornos del sistema nervioso central</i>	67
Tabla 10.	<i>Síndromes paraneoplásicos neurológicos clásicos y no clásicos</i>	69
Tabla 11.	<i>Anticuerpos onconeuronales</i>	73
Tabla 12.	<i>Criterios diagnósticos de un síndrome paraneoplásico del SNC</i>	74
Tabla 13.	<i>Anticuerpos y tumores asociados con la degeneración cerebelosa paraneoplásica (DCP)</i>	121
Tabla 14.	<i>Anticuerpos y tumores asociados con la encefalitis límbica</i>	129
Tabla 15.	<i>Comparación entre canalopatías genéticas y autoinmunes</i>	130
Tabla 16.	<i>Asociación entre las características clínicas y la presencia de anticuerpos anti-VGCC en los 39 pacientes con DCP</i>	144
Tabla 17.	<i>Características clínicas e inmunológicas de 15 pacientes con encefalitis límbica</i>	149
Tabla 18.	<i>Frecuencia de AGNA en los pacientes con síndromes neurológicos paraneoplásicos (SPN) y un cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) sin anticuerpos anti-Hu, Ri, o Zic4</i>	156
Tabla 19.	<i>Criterios diagnósticos de la neuromielitis óptica</i>	170
Tabla 20.	<i>Posibles canalopatías autoinmunes del SNC</i>	172

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AcCol	acetilcolina
ADN	ácido desoxiribonucleico
AE	ataxia episódica
AEC	ataxia espinocerebelosa
AGNA	anticuerpo nuclear anti-glial
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalepropiónico
ANNA 3	anticuerpo antineuronal nuclear tipo 3
APC	célula presentadora de antígenos
AQP4	aquaporina 4
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
BHE	barrera hematoencefálica
BOC	bandas oligoclonales
CACNA 1A	canal dependiente de voltaje tipo P/Q
CaM II	proteínquinasa dependiente de calcio/calmomodulina tipo II
Cav	canal de calcio dependiente de voltaje
Cc.	cáncer
CPCP	cáncer de pulmón de célula pequeña
DCP	degeneración cerebelosa paraneoplásica
EEG	electroencefalograma
ej.	ejemplo
EL	encefalitis límbica
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EMG	electromiograma
EMP	encefalomielitis paraneoplásica
ev.	endovenoso
FDG-PET	fluoro-2-deoxi-glucosa-PET
FLAIR	imagen atenuada con inversión de fluidos
GABA	ácido gamma-amino-butírico
GAD	descarboxilasa del ácido glutámico
GluR3	receptor ionotrópico del glutamato tipo 3
HLA	complejo mayor de histocompatibilidad
Ig	inmunoglobulina
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
K	potasio
Kv	canal de potasio dependiente de voltaje
LCR	líquido ceforraquídeo
mGluR1	receptor metabotrópico del glutamato
MHF	migraña hemipléjica familiar
MG	miastenia gravis
mRNA	RNA mensajero

Na	sodio
NaCl	cloruro sódico
Nav	canal de sodio dependiente de voltaje
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMO	neuromielitis óptica
nRAcCol	receptor nicotínico de acetilcolina
PANDAS	trastornos pediátricos neuropsiquiátricos autoinmunes asociados con infecciones estreptocócicas
PET	tomografía por emisión de protones
QT	quimioterapia
RAcCol	receptor de acetilcolina
RIA	radioinmunoensayo
RM	resonancia magnética
rNMDA	receptor de NMDA
REM	“rapid eye movement”, movimiento ocular rápido
RT	radioterapia
SCN	ver "Nav"
SGB	síndrome de Guillain-Barré
SIADH	síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética
SMEL	síndrome miasténico de Eaton-Lambert
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SPECT	tomografía computerizada con fotones de emisión única
SPN	síndrome paraneoplásico
TG2	transglutaminasa tisular tipo 2
(v)	voltaje
VGCC	canal de calcio dependiente de voltaje
VGKC	canal de potasio dependiente de voltaje

A. INTRODUCCIÓN

Las células, entre las que se incluyen las neuronas, necesitan proteínas de membrana para transportar iones a través de la membrana celular. A estas proteínas se las ha denominado canales iónicos, de los que existen múltiples tipos. Algunas de estas proteínas son específicas al tejido donde se encuentran y otras están distribuidas por todo el organismo. El potencial de reposo de las células depende exclusivamente de la presencia de estos canales iónicos. Así pues, no sorprende que éstos sean una parte fundamental de los procesos de señalización y fisiología neuronal. Su disfunción genera síndromes patológicos, algunos difíciles de diagnosticar y tratar. Uno de los hallazgos más relevantes en neurología ha sido el relacionar algunos síndromes neurológicos hereditarios con ciertas mutaciones genéticas. Esto se consiguió al descubrir que varios trastornos de la excitabilidad de la membrana muscular estaban asociados a mutaciones sin sentido de los canales de calcio, sodio y cloro, además de los receptores de acetilcolina. A estos trastornos se les denominó canalopatías. Se han identificado algunas de estas mutaciones genéticas de los canales iónicos del sistema nervioso, que dan lugar a trastornos neurológicos específicos¹. Se desglosarán las canalopatías hereditarias² y se estudiarán aquellas que puedan tener una etiología adquirida.

La existencia de trastornos del sistema nervioso periférico (SNP) adquiridos mediados por anticuerpos es conocida. Pueden afectar a canales iónicos dependientes de ligandos o dependientes de voltaje, provocando canalopatías adquiridas autoinmunes. Éstas serían un grupo de enfermedades neurológicas asociadas con anticuerpos contra canales iónicos específicos en el nervio o el músculo. Habitualmente, se cree que los anticuerpos tienen un efecto inhibitorio en la función del canal. Los mecanismos que inician la producción de

anticuerpos son desconocidos. Una infección vírica o bacteriana puede desencadenar una respuesta autoinmune contra el sistema nervioso en individuos susceptibles. En otros casos, los síndromes neurológicos están relacionados con la presencia de un tumor, es decir, son paraneoplásicos. Esto implica que derivan de una reacción autoinmune específica iniciada por la respuesta inmune contra el cáncer. A diferencia de los anticuerpos paraneoplásicos, aquellos contra canales iónicos están dirigidos a dominios extracelulares de las proteínas de membrana. Estos anticuerpos tienen el potencial de producir directamente efectos patogénicos uniéndose y modificando la función de dichas proteínas^{3, 4}. Cada anticuerpo contra un canal iónico está relacionado con un síndrome neurológico específico. La mayoría de los pacientes con anticuerpos anti-canales iónicos no tienen un tumor.

La asociación entre la presencia de autoanticuerpos séricos y un síndrome neurológico introduce el concepto de una etiología inmunomediada. Se necesitan otros criterios como la reproducción de las características de la enfermedad en un modelo animal o la demostración que los síntomas mejoran tras la eliminación del anticuerpo circulante, para poderse confirmar. Esto es conocido y se ha demostrado en trastornos neurológicos periféricos. La capacidad de los anticuerpos de cruzar la barrera hematoencefálica causando una disfunción del sistema nervioso central todavía debe probarse. Existe poca evidencia de que anticuerpos causen enfermedades neurológicas del SNC. Este sería el caso de la esclerosis múltiple o de los síndromes neurológicos centrales paraneoplásicos. La hipótesis es que los antígenos sean presentados a las células tipo T y que éstas crucen la BHE provocando un ataque inmunológico. Queda por determinar y demostrar si trastornos neurológicos centrales contra canales iónicos pueden tener una etiología autoinmune. Esto será fundamental para una mejor comprensión de la relación entre el sistema nervioso central y el sistema inmune, ayudando a desarrollar estrategias terapéuticas más eficaces.

I. CANALOPATÍAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

1. Canales iónicos

Los canales iónicos son elementos cruciales en los procesos de señalización neuronal y transmisión sináptica. Son estructuras de membrana formados por agregados de proteínas que contienen un poro central acuoso que permite el intercambio iónico entre la célula y el medio interno. Poseen tres funciones importantes: conducen iones, reconocen y seleccionan iones específicos y se abren o cierran en respuesta a señales eléctricas, mecánicas o químicas⁵. El flujo iónico es la fuente de corriente eléctrica que regula el potencial de membrana, siendo la base de la excitabilidad eléctrica. Los canales iónicos poseen estados funcionales dinámicos: en reposo están cerrados y activos, cuando permanecen abiertos también están en período activo, y en los estados refractarios permanecen cerrados e inactivos. El mejor conocimiento de estos complejos proteicos macromoleculares se ha conseguido gracias a tres avances científicos: la técnica de medición de la conductividad con fijación de membrana o pinzamiento zonal (“patch-clamp”), el uso de neurotoxinas selectivas y, la clonación y secuenciación de los genes que los conforman. La técnica del “patch-clamp” analiza la actividad de un único ión (conductancia) midiendo directamente el flujo de corriente a través de un único canal abierto⁶. Las neurotoxinas inactivan selectivamente diferentes subunidades del canal iónico permitiendo tanto la identificación de los componentes del canal como la determinación de sus funciones. Finalmente, los agregados proteicos que forman los canales están codificados por diferentes genes de los cuales, muchos ya han sido clonados y se han identificado las estructuras de las proteínas que codifican⁷.

Los canales son proteínas de membrana multiméricas glicosiladas dentro de la membrana lipídica. Aunque algunos son homomultímeros (combinación de subunidades α transmembrana iguales), la mayoría están conformados por subunidades distintas codificadas por genes diferentes, y se denominan heteromultímeros (compuestos por diferentes subunidades). Cada subunidad tiene una función diferente. La mayoría de canales contienen una subunidad principal y 3-4 subunidades auxiliares. Los canales que no se abren y cierran permiten el paso del flujo iónico por un mecanismo de concentración de gradiente. El paso de iones es pasivo, con entrada de Na^+ a la célula y salida de K^+ . Esto se equilibra con la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dependiente de ATP. Este tipo de canales se encuentran en neuronas y células gliales⁸.

Las neuronas tienen la capacidad de producir señales eléctricas gracias a la presencia de canales iónicos. Se mantienen gradientes de concentración diferentes para iones entre el interior y el exterior de la célula. El potasio, suele estar a concentraciones más elevadas en el citoplasma, y el resto de iones, sodio, calcio y cloro, tienen una distribución opuesta. Estos gradientes hacen posible un sistema de señalización eléctrica causando la despolarización e hiperpolarización de la célula, permitiendo la comunicación entre neuronas. Los canales están distribuidos por todo el sistema nervioso, estando presentes en el soma neuronal, dendritas, axones y sinápsis. El número y tipo de canales difiere en relación al tipo de neurona y su localización. En los axones la mayoría de canales iónicos son de Na^+ y K^+ , en las fibras mielínicas hay una gran concentración de canales de Na^+ , en el nodo de Ranvier, y en la unión neuromuscular hay mayoritariamente canales nicotínicos de tipo ligando.

Los factores que influyen en el movimiento iónico a través de la membrana son: (1) el gradiente de concentración, (2) el gradiente eléctrico y (3) la

permeabilidad. La conductancia es la medida que define qué iones fluyen por un material y se expresa como una carga por segundo por voltaje. La conductancia de un canal único (γ) se diferencia de la conductancia de la membrana (G) de todos los canales en la neurona. La conductancia es una constante de proporcionalidad, que define las propiedades del canal y la permeabilidad de un ión específico (γ). La dirección en la que los iones se mueven por el canal está regida por gradientes de concentración eléctrica o química. El punto en el que la fuerza impulsora química y la fuerza impulsora eléctrica están en equilibrio es el potencial de Nernst. Por encima o debajo de este punto, los iones fluyen en la dirección de la fuerza dominante. Los potenciales de Nernst de los cuatro tipos de iones principales: sodio +70mV, potasio -98mV, calcio +150mV, cloro -30 a -65mV. La activación o no de los canales modifica el potencial de membrana con lo que las propiedades de una célula pueden cambiar según el número de canales presentes y activos⁹.

Se han identificado diferentes tipos de canales iónicos en la membrana celular que pueden ser clasificados según su mecanismo de activación: los que no pueden abrirse o cerrarse (bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$), y los que si lo hacen y son: dependientes de ligando (ionotrópicos), dependientes de protones, controlados por segundos mensajeros (metabotrópicos) y dependientes de voltaje.

Los **canales dependientes de ligandos** son **ionotrópicos**, es decir, requieren de la unión de una sustancia o neurotransmisor, llamado ligando, al propio canal para permitir o no el paso de iones. Son proteínas integrales de membrana, formando tanto la zona de unión para el ligando natural como el poro conductor de iones, que puede ser abierto o cerrado por el ligando. Estos canales son el resultado de la unión de subunidades que forman un poro ion-selectivo. La composición de las subunidades de estos canales puede ser homo o heteromérica, por lo que pueden tener una gran diversidad de propiedades

fisiológicas o farmacológicas. En los mamíferos existen 3 grandes familias según el número de segmentos transmembrana presentes en las subunidades que forman los canales. La primera familia son los receptores P2X –adenosina trifosfato (ATP); estos son canales catiónicos y contienen 3 subunidades. Cada subunidad contiene 2 segmentos transmembrana separados por un círculo extracelular. Se han descrito siete subunidades P2X¹⁰. La segunda familia es la formada por receptores catiónicos activados por glutamato en los que se incluyen los receptores del NMDA (N-metil-D-aspartato), del AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalepropiónico) y de kainato. Cada subunidad contiene un dominio extracelular amino-terminal que forma la mitad de la región agonista, estando separados los dos primeros segmentos por un bucle-P. La tercera familia es la mayoritaria y es la llamada la “super-familia del receptor del bucle-cis”, porque tiene una cisterna en el bucle del dominio extracelular. La conductancia del canal está regulada por la unión a un neurotransmisor u otra sustancia química (ligando). Los neurotransmisores que funcionan como ligandos son: glutamato, glicina, GABA y acetilcolina. Esta familia incluye los receptores nicotínicos de acetilcolina (nRAcCol), los receptores muscarínicos (estos son metabotrópicos, el receptor es activado por la muscarina y activa una cascada de segundos mensajeros que son los que actúan finalmente sobre el canal), los receptores de glicina, los receptores de serotonina 5-HT₃, los receptores activados por zinc y los receptores del GABA_A y GABA_C.

Los **canales dependientes de protones** son sensibles al cambio en pH y han sido recientemente descritos. El mecanismo de activación es la presencia de un pH bajo. Se han clonado tres tipos de canales: el canal de sensor ácido del ganglio dorsal, el canal de sensor ácido y el canal homólogo de la degenerina mamífera. Estos canales se encuentran en todo el sistema nervioso¹¹, sobretodo en neuronas sensitivas.

Los **canales activados por segundos mensajeros (metabotrópicos)** requieren que una sustancia se una a un receptor de membrana alejado del canal para que se active una cadena de segundos mensajeros intracelulares y estos activen finalmente el canal. La mayor parte de estos canales están en las membranas post-sinápticas. Se abren indirectamente, el efector y el receptor son moléculas separadas y diferentes. Hay dos grandes tipos de canales, los receptores acoplados a proteínas G y los receptores acoplados a tirosinquinasa. Las proteínas G son proteínas que se unen a una o varias moléculas del nucleótido guanina. A esta familia pertenecen los receptores α y β de la adrenalina, el receptor muscarínico de la acetilcolina, el receptor GABA_B, algunos receptores de glutamato, de serotonina y de neuropéptidos. La sustancia activa se une al receptor, esto desencadena una cascada de segundos mensajeros inducida por las proteínas G. Los receptores de la tirosinquinasa son importantes por ejemplo en la regulación de la insulina y en procesos de señalización celular implicados en cáncer¹². A este tipo de receptores se unen fundamentalmente péptidos como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento nervioso.

Los **canales dependientes de voltaje** permiten el paso de iones dependiendo del voltaje transmembrana. Se van a desglosar en profundidad, puesto que son los que serán estudiados a lo largo de este trabajo. Están formados por una subunidad para estructurar el poro (conocida como subunidad α) y una serie de subunidades accesorias (β , γ). La subunidad α contiene un poro acuoso central situado dentro de la membrana; el ión específico la atraviesa en respuesta a la activación mediada por cambios de voltaje. Esta subunidad determina la selectividad iónica y media la función dependiente del voltaje, permitiendo que los sensores de voltaje cambien su conformación según los campos eléctricos de membrana. Las subunidades α de los diferentes canales dependientes de

voltaje están relacionadas y están conservadas a lo largo de la evolución. Las subunidades accesorias pueden ser citoplasmáticas o extracelulares. La función de éstas es la de modular la conductibilidad de la subunidad α . La mayoría de las canalopatías neurológicas de etiología genética afectan a la subunidad α .

El sistema de nomenclatura utilizado para denominar a los canales dependientes de voltaje, está basado en el símbolo químico del principal ión permeable (Na- sodio, Ca- calcio, K- potasio), seguido de la abreviación del ligando. En el caso de los canales dependientes de voltaje (v); estudiaremos los canales: Nav, Cav y Kv. A lo largo de los últimos años, se han utilizado diferentes nomenclaturas para clasificar los canales en base a otras características y no sólo el tipo de ión del canal. A lo largo de este trabajo, utilizaremos la nomenclatura estandarizada aprobada por la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) para los canales dependientes de voltaje, sin embargo, vamos a explicar la evolución y diferentes nomenclaturas existentes.

Los canales de sodio dependientes de voltaje, que en un inicio no seguían ninguna nomenclatura ordenada, se clasificaron finalmente basándose en aquella elaborada para los canales de potasio, que actualmente es la más utilizada¹³. Se utiliza un sistema numérico para definir las subfamilias y subtipos según las similitudes entre las secuencias de los aminoácidos de los canales (relación filogenética). El nombre de un canal individual consiste en el símbolo químico del principal ión permeable (Na) con el regulador principal fisiológico (v). El número que sigue al regulador fisiológico indica la subfamilia del gen que codifica el canal (Nav1), y el número que sigue identifica una isoforma específica del canal (Nav1.1), que sigue el orden cronológico de identificación del gen. Variantes génicas de cada tipo de canal se identifican con letras separadas por un punto de los números (Nav1.1a). Al menos 20 exones codifican cada una de las nueve proteínas de la subunidad α del canal de sodio^{14, 15, 16}.

Los canales de calcio dependientes de voltaje han basado las nomenclaturas en características de la subunidad $\alpha 1$: (a) el gen que la codifica; se han identificado hasta 10 genes que codifican las subunidades $\alpha 1$ del canal de calcio: CACNA1S, C, D, F, A, B, E, G, H, I; (b) la familia y el orden cronológico de su descubrimiento, (c) la sensibilidad a una neurotoxina: canales sensibles a la dihidropiridina (tipo L), a la ω -conotoxina-GVIA (tipo N) y aquellos sensibles a la ω -agatoxina-IVA (tipo P/Q) o (d) el tipo de corriente del poro de los canales nativos no clonados (tipos L, N, P/Q y R). La IUPHAR aprobó una nomenclatura similar a la de los canales de potasio y sodio (Cav) basada en la familia y orden cronológico (criterio b). El identificador numérico corresponde al gen de la subunidad $\alpha 1$ (1, 2 o 3) y el orden cronológico del hallazgo de la subunidad $\alpha 1$ dentro de esa subfamilia^{17, 18, 19}.

Los canales de potasio dependientes de voltaje fueron los primeros donde se introdujo la nomenclatura estandarizada de la IUPHAR. Sin volver a mencionar el orden de las siglas, hay que mencionar que se crearon 6 subfamilias Kv1-Kv6, saltándose la subfamilia Kv7, asignándose los nuevos genes descubiertos como Kv8 y Kv9. Mencionaremos, brevemente, que un grupo de genetistas, desarrolló en 1997 una nomenclatura paralela, que designó símbolos oficiales desarrollados por el Comité de Nomenclatura del Genoma Humano (HGNC) dentro del proyecto genoma humano (HUGO)²⁰. En esta nomenclatura, se coloca en mayúsculas la letra del ion principal del canal en inglés (S, C, K) seguido de CN (abreviatura de canal) y luego letras alfabéticas ordenadas en mayúsculas para diferenciar las familias de genes y un número que indica el subtipo de familia. Por ejemplo, los genes de las subunidades Kv se denominan del KCNA hasta el KCND, utilizando las letras A, B, C y D para los cuatro tipos de familias de genes. El número específico del gen es derivado de la

nomenclatura Kv. Esto ocurre también con los genes de Na y Ca (ej. Nav1.1=SCN1A, Nav1.2=SCN2A, etc.).

Se van a desglosar las características y función de los canales iónicos dependientes de voltaje del sistema nervioso. Hay varios tipos de canales dependientes de voltaje: sodio, calcio y potasio.

a. Canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)

Hodgkin y Huxley nos revelaron que en la mayoría de las neuronas, el flujo iónico a través de los canales de sodio está influyendo en la recuperación del potencial de acción de la membrana celular. Aunque no fueron capaces de visualizar los canales de sodio, sí que se pudieron descifrar las características más importantes de los mismos. Aproximadamente 40 años después, Noda y colaboradores, en 1984, clonaron el primer canal de sodio²¹. Se adquirió el concepto de que existían diferentes tipos de canales de sodio cuando, estos investigadores, demostraron que dentro del cerebro de un mamífero, existían al menos tres genes para codificar canales de sodio, cada uno codificando una molécula diferente. Algunas neuronas coexpresan diferentes canales de sodio, por lo que tienen diferentes propiedades transductoras y codificadoras²². Además, se ha observado que la expresión de los canales de sodio es dinámica. La plasticidad neuronal ha sido estudiada con respecto a la potencia y depresión sináptica, la aparición o modelación de las dendritas y el reclutamiento de neuronas preexistentes o nuevas en los circuitos funcionales. La plasticidad en la expresión de los genes que codifican los canales de sodio dependientes de voltaje resulta en un aumento en el uso de los canales; que a su vez, produce cambios en las propiedades eléctricas de las neuronas. Estos cambios pueden ser importantes en enfermedades caracterizadas por una hipo- o

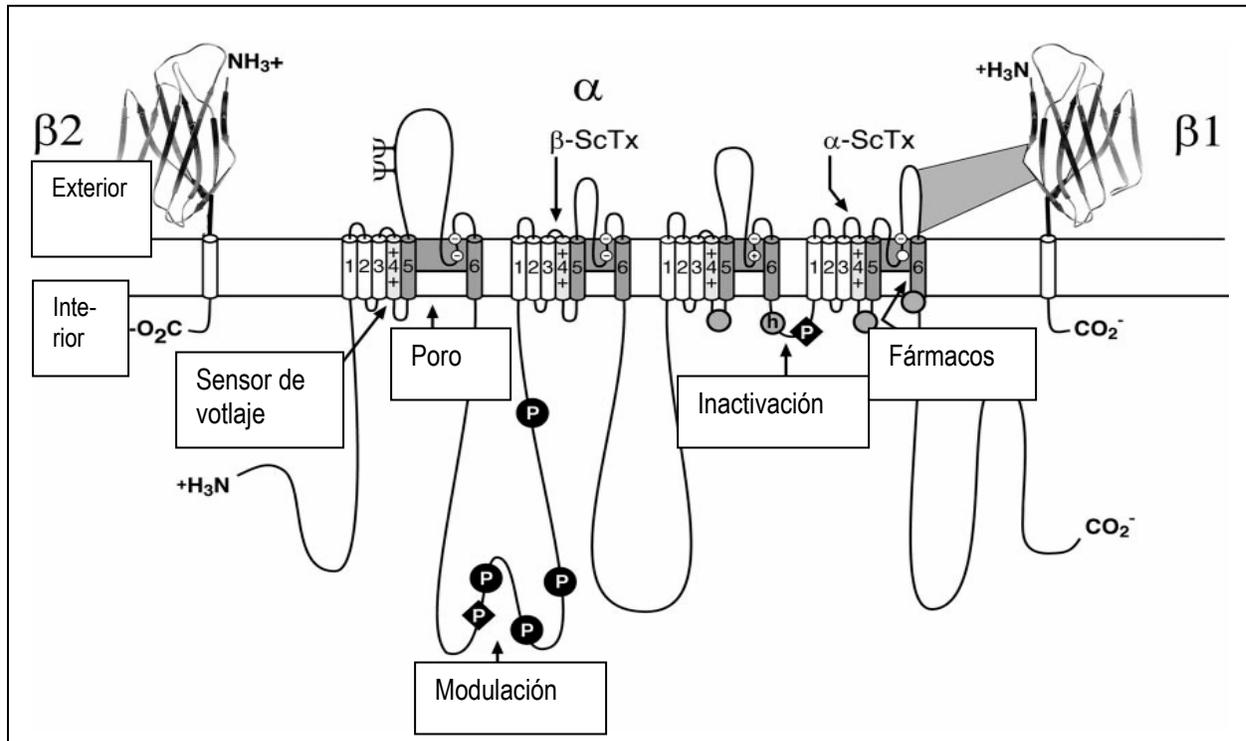
hiperexcitabilidad neuronal. Las secuencias de aminoácidos de las subunidades α de los canales de sodio y calcio contienen cuatro dominios homólogos en tándem que se parecen a las subunidades α de los canales de potasio. A pesar de todo, existen diferencias entre todos estos canales. La secuencia de aminoácidos que conforma la selectividad de cada canal es diferente. El mecanismo de inactivación del canal es diferente también en todas ellas²³.

Los canales de sodio dependientes de voltaje intercambian tres estados funcionales dependiendo del potencial de membrana. En membranas excitables, una despolarización brusca causa un aumento rápido de la permeabilidad del Na^+ local debido a la apertura (activación)²⁴ del canal. Para que esto ocurra, los sensores de voltaje (segmentos S4) de la proteína del canal deben moverse hacia fuera, empujados por el cambio en el potencial de membrana y luego traducir la energía conformacional a otras estructuras que se mueven dejando paso a los iones de sodio. Este aumento en la permeabilidad del sodio causa una despolarización de la membrana que caracteriza el inicio de un potencial de acción. La activación de un canal es transitoria y pasa a un estado inactivo hasta que la membrana se repolariza, recuperándose tras la inactivación. Durante el proceso de recuperación, los canales pueden sufrir un proceso de desactivación, es decir, la transición de un estado abierto a uno cerrado²⁵. Todo este proceso ocurre en milisegundos.

Los canales de sodio presentes en el sistema nervioso central (SNC), al igual que en el corazón, contienen, además de la subunidad α , 4 subunidades β ($\beta 1$ a la $\beta 4$)²⁶. Las propiedades funcionales de los diferentes tipos de canales de sodio son similares. Hay nueve tipos de isoformas de los canales de sodio en los mamíferos. Todas ellas tienen más de un 50% de similitud en la secuencia de aminoácidos de los dominios transmembrana y extracelular. Esta similitud no es tan evidente en los canales de calcio y potasio. Se han caracterizado nueve

subunidades α Nav1.1-Nav1.9; existe una décima isoforma (Nax) que probablemente también funcione como un canal de sodio, aunque hay otras hipótesis que debido a su localización y estructura, consideran que no es un canal dependiente de voltaje sino un sensor de sal (NaCl). Genéticamente, hay isoformas que están más relacionadas entre sí debido a su proximidad en el genoma. Los genes para las isoformas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.7 y Nax, están localizados en el cromosoma 2; y los genes de las isoformas Nav1.5, Nav1.8 y Nav1.6 (todas ellas resistentes a la tetrodotoxina) están localizados en el cromosoma 3. La isoforma Nav1.4 está localizada en otro cromosoma y puede considerarse como otro grupo.

Figura 1. Canal de sodio. Organización transmembrana de las subunidades de un canal de sodio (según Yu y Catterall, 2003)



Las estructuras primarias de las subunidades de los canales dependientes de voltaje se ilustran como diagramas transmembrana. Los cilindros representan segmentos α -helicoidales. Las líneas sencillas representan cadenas de polipéptidos de cada subunidad, con una longitud similar y proporcional a los residuos de aminoácidos en los subtipos de canales de sodio encontrados en el cerebro. Los dominios extracelulares de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ se muestran como plegamientos de inmunoglobulinas. El símbolo Ψ intenta mostrar las zonas probables de glicosilación ligadas al dominio N. Las localizaciones P son zonas demostradas donde se produce una fosforilación por la protein-quinasa tipo A (si está rodeado por un círculo) o por la protein-quinasa C (si está rodeado por un rombo). Además, los segmentos del poro S5-P-S6, círculos blancos, y los anillos exteriores (EEDD) o interiores (DEKA) de residuos aminos que conforman el filtro de selectividad iónica y el lugar de unión con la tetrodotoxina. Los sensores de voltaje S4, y los círculos abiertos están implicados en formar el receptor de la puerta de inactivación. Se muestran también las localizaciones del lugar de unión de las toxinas α - y β - del escorpión y el lugar de interacción entre las subunidades α y $\beta 1$.

Las isoformas de los canales de sodio varían en su localización y modulación (ver Tabla 1, en negrita lo referido al SNC). Los subtipos Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.6 son abundantes en el sistema nervioso central. Generalmente, Nav1.1 y Nav1.3 están localizados en el soma de la neurona, donde controlan la excitabilidad neuronal mediante la integración de los impulsos sinápticos y la propagación a los compartimentos axonales y dendríticos. El subtipo Nav1.2, está expresado en axones no mielinizados donde conduce el potencial de acción. Los subtipos Nav1.1 y Nav1.6 también se expresan abundantemente en el sistema nervioso periférico (SNP), pero los canales de sodio que más se observan en el SNP son tres isoformas que han sido clonadas de neuronas de ganglios de la raíz dorsal: Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9. De éstas, Nav1.7 se expresa abundantemente en el SNP y parece estar situado en los axones, donde puede que funcione en la iniciación y conducción de los potenciales de acción. Existe una expresión más restringida de los canales de Nav1.8 y Nav1.9 en el sistema nervioso, estos canales están expresados en neuronas sensitivas pequeñas de los ganglios del nervio trigémino y los ganglios de la raíz dorsal, donde tienen un papel fundamental en la percepción del dolor. Los subtipos Nav1.4 y Nav1.5 son canales del músculo que controlan la excitabilidad de los miocitos cardíacos.

Tabla 1. Tipos de canales de sodio según subunidad α y su localización en el sistema nervioso humano (según Catterall *et al.*, 2005 ; Yu y Catterall, 2003)

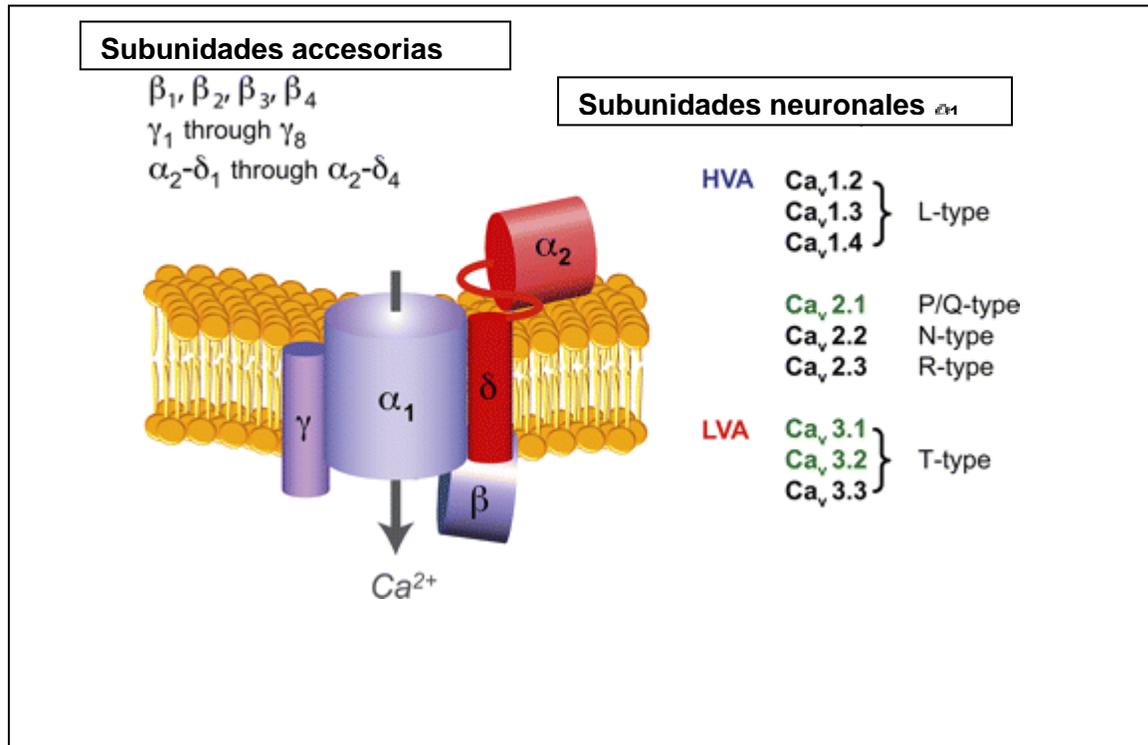
Canal de Na ⁺ Gen	Variantes	Función	Tejido	Localización Sistema Nervioso
Nav 1.1 SCN1A	Nav 1.1a	1) Propagación señales sinápticas: dendritas-soma 2) Integración señales eléctricas	SNC (soma neurona) SNP Corazón	Cerebelo, estriado, hipocampo, tálamo. Soma y dendritas. Miocitos cardíacos
Nav 1.2 SCN2A	Nav 1.2a	1) Potencial acción axonal 2) Liberación neurotransmisores presinápticos	SNC (axones no mielinizados)	Axones+terminaciones
Nav 1.3 SCN3A	Nav 1.3a Nav 1.3b	1) Control excitabilidad neuronal 2) Definición umbral del potencial acción inicial y de propagación del soma a dendritas y axones	SNC (soma neurona)	Cerebro embrionario y post-natal
Nav 1.4 SCN4A		Control excitabilidad de miocitos esqueléticos	Músculo esquelético	
Nav 1.5 SCN5A		Control excitabilidad de miocitos esqueléticos y cardíacos	Corazón, Músculo esquelético	
Nav 1.6 SCN8A	Nav 1.6a	Iniciación del potencial acción y transmisión neuronas centrales y axones mielinizados En desarrollo, contribuye a maduración nódulos Ranvier (axones mielinizados)	SNC SNP	Soma y dendritas proximales granulares, piramidales cerebelo, cortex cerebral e hipocampo. Cels Purkinje cerebelo, tronco y médula espinal Nódulos Ranvier
Nav 1.7 SCN9A		Inicio y conducción del potencial de acción	SNP Cc. Medular tiroides	Axones
Nav 1.8 SCN10A		Percepción dolor: iniciación y transmisión del potencial de acción	SNP	Neuronas amplio rango dinámico sensitivas- asta dorsal
Nav 1.9 SCN11A		Percepción del dolor Despolarización del potencial de reposo, amplifica el umbral lento de despolarización –excitabilidad	SNP	Neuronas amplio rango dinámico sensitivas ganglio trigémino y asta dorsal
Nax SCN6A SCN7A		Sensor NaCl Canal dependiente de voltaje?	Corazón, útero Astrocitos	

Se señalan en negrita aquellas que afectan al SNC.

b. Canales de calcio dependientes de voltaje (Cav)

Los canales de calcio dependientes de voltaje median la entrada de calcio en la célula como respuesta a la despolarización de la membrana y regulan los procesos intracelulares como la contracción, secreción, neurotransmisión, liberación de neurotransmisores presinápticos, activación de enzimas y la expresión génica, además de la supervivencia neuronal, la diferenciación y la plasticidad, puesto que los iones de calcio son, además, segundos mensajeros intracelulares. Pertenecen a una super-familia de diferentes proteínas transmembrana que conforman los canales iónicos²⁷. Los canales de calcio que se han caracterizado bioquímicamente son proteínas complejas compuestas de cuatro o cinco subunidades diferenciadas²⁸. Los canales de calcio son heterómeros que contienen subunidades proteicas que poseen diferentes funciones. Forman pasos selectivos del calcio a través de la membrana celular. Están codificados por nueve tipos de genes (SCN1A, SCN2A,...) que codifican las diferentes subunidades α de las isoformas; además hay cuatro genes que codifican las subunidades β accesorias (SCN1B, SCN2B,...). Hay otras subunidades accesorias γ - $\alpha 2$ - δ que son componentes de la mayoría de los canales de calcio. Aunque las subunidades accesorias modulan las propiedades del canal, la diversidad funcional, electrofisiológica y farmacológica se origina en la existencia de diferentes subunidades $\alpha 1$. Las subunidades α están construidas de manera simétrica y tienen cuatro dominios (D1-D4) que cada uno contiene 6 segmentos que se ensanchan (S1-S6) y una región (S5-S6) que controla la selectividad iónica y la permeabilidad. El segmento S4, funciona como el sensor de voltaje y es anfipático con múltiples aminoácidos básicos (arginina, lisina) rodeados por residuos hidrofóbicos.

Figura 2. Estructura y subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje
(según Khosravani *et al.*, 2006²⁹)



Se observa el poro principal formando la subunidad α_1 , más las subunidades accesorias β , γ , y $\alpha_2\text{-}\delta$. Las diferentes unidades α_1 corresponden a diferentes isoformas de los canales de calcio identificados en neuronas. Como se observa, los canales se definen por la corriente de calcio que median que puede ser de alto voltaje (HVA), donde se incluyen los canales con corrientes tipo L, P/Q, N y R; y los canales de bajo voltaje (LVA), donde se incluye el canal con corriente tipo T. Se desglosan también las diferentes subunidades α_1 que codifican los canales. Diferentes subunidad pueden codificar canales con los mismos tipos de corrientes.

Originalmente, los canales de calcio dependientes de voltaje se dividieron en dos grupos, según las características electrofisiológicas de la cinética de apertura y cierre del canal, los activados por alto voltaje y los activados por bajo voltaje. El umbral de activación de la corriente de calcio a través de los canales de alto voltaje es entre -40mV y -10mV, mientras que el umbral de activación de la corriente a través de los canales de bajo voltaje es entre -60mV y -70mV. Los canales de alto voltaje se subdividen en canales tipo L, N, P/Q y R (aunque este canal en alguna ocasión se clasifica como de voltaje intermedio). Mientras que los canales de bajo voltaje están formados por el tipo T. Las corrientes de calcio **tipo L** requieren una fuerte despolarización para activarse y tienen una mayor duración funcional. Se localizan sobretodo en el músculo y las células endocrinas, donde inician la contracción muscular y secreción hormonal; aunque también pueden encontrarse en tejido neuronal. Las corrientes de **tipo N, P/Q y R**, también se activan con alto voltaje. Éstas se bloquean por otro tipo de toxinas que no afectan a las corrientes tipo L. Concretamente, la corriente tipo N se inactiva de forma selectiva por las ω -conotoxinas GVIA y MVIIA, dos péptidos aislados de caracoles marinos; y el tipo P/Q se inhibe por la ω -agatoxina IVA. Estas corrientes se encuentran sobretodo en las neuronas y terminaciones sinápticas, donde inician la neurotransmisión en las sinápsis rápidas y median la entrada de calcio al soma y dendritas. La corriente de calcio **tipo T** es activada por bajo voltaje y es transitoria. Estos Cav se expresan en multitud de células donde controlan los potenciales de acción en patrones de descarga repetitiva. En el músculo actúan como moduladores de la contracción (ver Tabla 3). Sin embargo, esta clasificación por tipos de corrientes de calcio, no debería ser aplicada de forma rígida, puesto que algunos de los canales activados por alto voltaje, pueden, bajo ciertas circunstancias, activarse por voltajes negativos.

Genéticamente, se conocen al menos diez genes que codifican para las subunidades $\alpha 1$. Históricamente, como se ha mencionado, se habían dado

diferentes nombres a dichos genes, creando nomenclaturas confusas. Actualmente y desde que se clonaron genes humanos, se utiliza la nomenclatura propuesta por Ertel y colaboradores, aprobándose más tarde por el Subcomité para los Canales de Calcio de la NC-IUPHAR. Esta es la nomenclatura que se basa en utilizar el símbolo químico del ión principal, con el principal regulador fisiológico (voltaje), Cav. Los identificadores numéricos corresponden a la subfamilia del gen de la subunidad (1 a 3) y el orden de su descubrimiento dentro de aquella subfamilia. Según esto, la subfamilia Cav1.1 (Cav1.1 a Cav1.4) incluye canales que contienen una subunidad α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} o α_{1F} y que median corrientes de tipo L. La subfamilia Cav2 (Cav2.1 a Cav2.3) incluye canales que contienen la subunidad α_{1A} , α_{1B} o α_{1E} que median corrientes de tipo P/Q o R. La subfamilia Cav3 (Cav3.1 a Cav3.3) incluye canales que contienen α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} , que median las corrientes tipo T (ver Tabla 2).

Tabla 2. Nomenclatura de genes clonados de subunidades canales de Ca^{2+} humanos (según Lory *et al.*, 1997³⁰)

Canal (IUPHAR)	Subunidad α	Tipo de Canal (corriente)	Nomenclatura gen (HUGO)	Cromosoma
Cav1.1	α_{1S}	L	CACNA1S	1q31-32
Cav1.2	α_{1C}	L	CACNA1C	12p13.3
Cav1.3	α_{1D}	L	CACNA1D	3p14.3
Cav1.4	α_{1F}	L	CACNA1F	Xp11.23
Cav2.1	α_{1A}	P/Q	CACNA1A	19p13.1
Cav2.2	α_{1B}	N	CACNA1B	9q34
Cav2.3	α_{1E}	R	CACNA1E	¿?
Cav3.1	α_{1G}	T	CACNB2	¿?
Cav3.2	α_{1H}	T	CACNB3	¿?
Cav3.3	α_{1I}	T	CACNB4	¿?

La secuencia completa de aminoácidos de las subunidades α_1 es en más de un 70% idéntica dentro de una familia, determinando especificidad, pero menos de un 40% entre familias. Las sensibilidades farmacológicas entre los diferentes canales se expresan en la Tabla 3, donde se mencionan los antagonistas específicos para cada uno de los tipos de canales.

Las subunidades accesorias del canal de calcio $\alpha_2\text{-}\delta$ ($\alpha_2\delta\text{-}1, \text{-}2$), β ($\beta_1, 2, 3, 4$) y γ ($\gamma_{1,2,3,4,5,6,7,8}$) están codificadas por tres, cuatro y ocho genes diferentes respectivamente. Mientras que el canal Cav1.1 del músculo esquelético contiene la subunidad γ_1 , todavía no se conoce si todos los canales de calcio contienen subunidades γ . Las subunidades β tienen efectos funcionales sobre la modulación del canal y de la membrana con subunidad α_1 y α_2 . En sistemas de expresión heterólogos, subunidades β y $\alpha_2\text{-}\delta$ diferentes en combinación con una subunidad α_1 dan lugar a canales de calcio con propiedades funcionales diferentes. Los canales funcionalmente diferentes pueden formarse con variantes de la subunidad α_1 . Todos los canales, excepto el α_1 1.1, se expresan en el cerebro, con una distribución diferencial en diferentes poblaciones neuronales y localizaciones diferentes dentro de la misma neurona. Por lo tanto, el potencial para la existencia de una heterogeneidad estructural y funcional de los canales de calcio en el cerebro, es enorme.

Tabla 3. Funciones fisiológicas, localización y farmacología de los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav)
(según Trimmer y Rhodes, 2004 ³¹)

Canal	Corriente	Localización	Antagonistas Específicos	Características funcionales	Funciones Celulares
Cav1.1	L	Músculo esquelético – tubulos transversos	Dihidropiridinas, fenilalquilaminas	Activados por alto voltaje, desactivación lenta	Acoplamiento excitación-contracción
Cav1.2	L	Miocitos cardíacos, células endocrinas, cuerpos neuronales y dendritas proximales en cortex e hipocampo	Dihidropiridinas, fenilalquilaminas	Activados por alto voltaje, desactivación lenta (dependiente calcio)	Acoplamiento excitación-contracción, liberación hormonas, regulación transcripción, integración sináptica
Cav1.3	L	Células endocrinas, cuerpos neuronales y dendritas en hipocampo	Dihidropiridinas, fenilalquilaminas	Activados por voltaje moderado, desactivación lenta (dependiente calcio)	Liberación hormonas, regulación transcripción, integración sináptica
Cav1.4	L	Retina	No conocido	Activados por voltaje moderado, desactivación lenta (dependiente calcio)	Liberación neurotransmisores desde células bipolares y conos retina
Cav2.1	P/Q	Terminaciones nerviosas y dendritas en la capa molecular y cels Purkinje cerebelo Unión neuromuscular	ω -agatoxina IVA	Activados por voltaje moderado, desactivación moderada	Liberación neurotransmisores
Cav2.2	N	Terminaciones nerviosas y dendritas del estriado, cortex e hipocampo	ω -CTx-GVIA	Activado por alto voltaje, desactivación moderada	Liberación neurotransmisores
Cav2.3	R	Cuerpos neuronales y dendritas del globo pálido, tálamo, amígdala anterior, núcleos subtalámicos, hipotálamo	SNX-482	Activación por voltaje moderado, desactivación rápida	Descargas repetitivas
Cav3.1	T	Cuerpos neuronales y dendritas de las células Purkinje del cerebelo, miocitos cardíacos	Ninguno	Activados por voltaje bajo, desactivación rápida	Marcapasos, Descargas repetitivas
Cav3.2	T	Cuerpos neuronales y dendritas de células granulares del núcleo dentado y neuronas piramidales, Miocitos cardíacos	Ninguno	Activados por voltaje bajo, desactivación rápida	Marcapasos, Descargas repetitivas
Cav3.3	T	Cuerpos neuronales y dendritas de las interneuronas en el cortex cerebeloso	Ninguno	Activados por voltaje bajo, desactivación moderada	Marcapasos, Descargas repetitivas

Electrofisiológicamente, los canales presentan cuatro tipos de corrientes de calcio con características diferentes, lo que permite clasificar a los canales en los tipos L, P/Q, R, N, y T.

Canales tipo L: las propiedades biofísicas de las corrientes tipo L se describieron por primera vez en neuronas del asta dorsal del pollo en 1985³², observando, posteriormente, que su distribución en humanos es amplia. Se localizan en: músculo esquelético, miocitos cardíacos, células endocrinas, cuerpos neuronales y dendritas en el hipocampo y la retina. La estructura molecular del canal tipo L, se ha estudiado en el músculo esquelético sobretodo. Las funciones de los canales tipo L están en relación a la generación de potenciales de acción y la transducción de señales en la membrana celular. Recientemente se les ha asociado un papel en la liberación de neurotransmisores en el SNC³³.

Canales tipo P/Q: este canal se denominó “P” porque se describió por primera vez en las células de “P”urkinje en 1989³⁴. Las corrientes de calcio tipo P se activan por encima de -50mV y muestran muy poca inactivación durante un período de un segundo. Se han implicado en la liberación de neurotransmisores en algunas sinápsis. A diferencia del canal tipo N, el tipo P tiene una selectividad para un ión monovalente en la ausencia de cationes divalentes. En 1995, se describió el canal de calcio tipo Q como una categoría separada, porque es una corriente que se inactiva rápidamente, asociándose funcionalmente a la liberación de neurotransmisores³⁵, se localiza en células granulares de la capa molecular del cerebelo³⁶. Todavía queda por determinar si la naturaleza del poro de la subunidad $\alpha 1A$, principal componente de los canales P y Q, es igual o no en ambos³⁷, puesto que las diferencias aparentes entre las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los canales P y Q, podría estar causada por la presencia de diferentes isoformas de poro. Otra opción sería que las

diferencias radicarán en las subunidades accesorias. Están compuestos de las siguientes subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2/\delta$ y β . Estudios inmunohistológicos han mostrado que están ampliamente expresados en el SNC humano. En contraste con la localización somatodendrítica de los canales tipo Cav1, los estudios sobre la localización de las subunidades de los Cav2, los han identificado tanto en axones como en las somatodendritas. El subtipo Cav2.1, se localiza especialmente en áreas ricas en terminales sinápticas, específicamente en la capa molecular del cerebelo y la zona del hipocampo CA3. La tinción de las terminaciones nerviosas en estas localizaciones es consistente con la función de los canales de calcio tipo P/Q como reguladores de la liberación de neurotransmisores y la integración neuronal. En las neuronas del globo pálido, la microscopía inmunoelectrónica ha revelado que además de la tinción de las terminaciones nerviosas, la reacción con inmunoperoxidasa también se observaba en las dendritas. Además, en las dendritas de las células de Purkinje, el Cav2.1 está colocalizado y asociado, mediante una interacción física directa, con los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR1). Este canal, en respuesta a una despolarización de la membrana, regula el flujo hacia el interior de Ca^{2+} extracelular, resultando no sólo en la liberación de neurotransmisores, sino que incluso se ha implicado como mediador en la transmisión neuromuscular³⁸.

Canales tipo R: se descubrieron después del tipo Q, y se les denominó R por “restantes” y además era la letra correlativa después de la Q. Las propiedades electrofisiológicas son similares al tipo Q y N. Corresponden a la subunidad $\alpha 2.3$. Se localizan en cuerpos neuronales y dendritas del globo pálido, tálamo, amígdala anterior, hipotálamo y núcleos subtalámicos. Tienen una función de actuar con descargas repetitivas.

Canales tipo N: están localizados en las neuronas de los ganglios del asta dorsal, además del cortex e hipocampo. Los estudios de localización de los receptores tipo Cav2.2 se realizaron utilizando autoradiografía con una toxina específica para la subunidad $\alpha 2.2$: la conotoxina ^{125}I -GVIA. Esto reveló altas cantidades de estos canales en el estriado, hipocampo, cortex y cerebelo, sobretodo en localizaciones con muchas sinapsis. Su función, al activarse por alto voltaje, es la de liberar neurotransmisores de la sinapsis.

Canales tipo T: la existencia de una corriente tipo T se descubrió en 1981 en neuronas del núcleo olivar utilizando electrodos intracelulares³⁹. Se han identificado tres tipos de genes que codifican los canales tipo T: CACNA1G, que codifica la subunidad Cav3.1; el CACNA1H que codifica la subunidad Cav3.2 y el CACNA1I que codifica la Cav3.3. Median el espectro de funciones fisiológicas que incluyen la actividad del marcapasos y varias formas de oscilaciones neuronales fisiológicas y fisiopatológicas. Incluso, se ha demostrado recientemente⁴⁰, que estos canales pueden dar lugar a la liberación de calcio inducida por calcio, en neuronas del núcleo paraventricular del tálamo y otras neuronas de la línea media asociadas con el sistema tálamo-cortical. Estos canales se activan e inactivan cerca del potencial de membrana en reposo de las neuronas (aproximadamente -60mV); tienen una cinética de activación muy rápida y se desactivan de forma más lenta. Existe también un solapamiento en las dependencias de voltaje para la activación e inactivación, lo que da lugar a un fenómeno denominado “ventana de corriente”. En los voltajes de membrana, donde la ventana de corriente es operacional, una pequeña fracción de los canales tipo T no se inactiva nunca de forma completa y puede ser reclutada rápidamente para el flujo de calcio durante la despolarización. La localización de estos canales aun no se ha identificado del todo de manera inmunocitoquímica. Sin embargo, los estudios de neuroimagen funcional y electrofisiológicos sugieren que están localizados cerca del soma neuronal y en neuronas

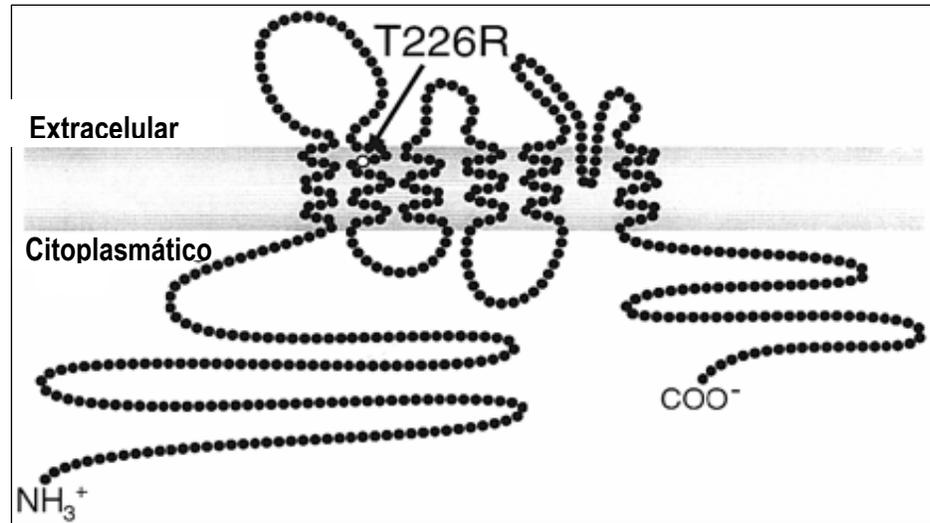
dendríticas algo más distales^{41, 42, 43}. Incluso estudios más recientes, usando técnicas electrofisiológicas y farmacológicas, se observa la presencia de este tipo de canales en células reticulares del tálamo⁴⁴.

c. Canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)

La estructura cristalina del canal de potasio de una bacteria fue resuelta en 1998, revelando a nivel atómico, la base estructural de los mecanismos fundamentales de este tipo de canales⁴⁵. Los canales de potasio establecen el potencial de membrana basal, repolarizan las neuronas tras los potenciales de acción y median señales que se transmiten por debajo del umbral. Es decir, son los reguladores fundamentales de la excitabilidad neuronal y controlan la frecuencia y forma del potencial de acción, la secreción de hormonas y neurotransmisores. Hay diferentes tipos de canales de potasio.

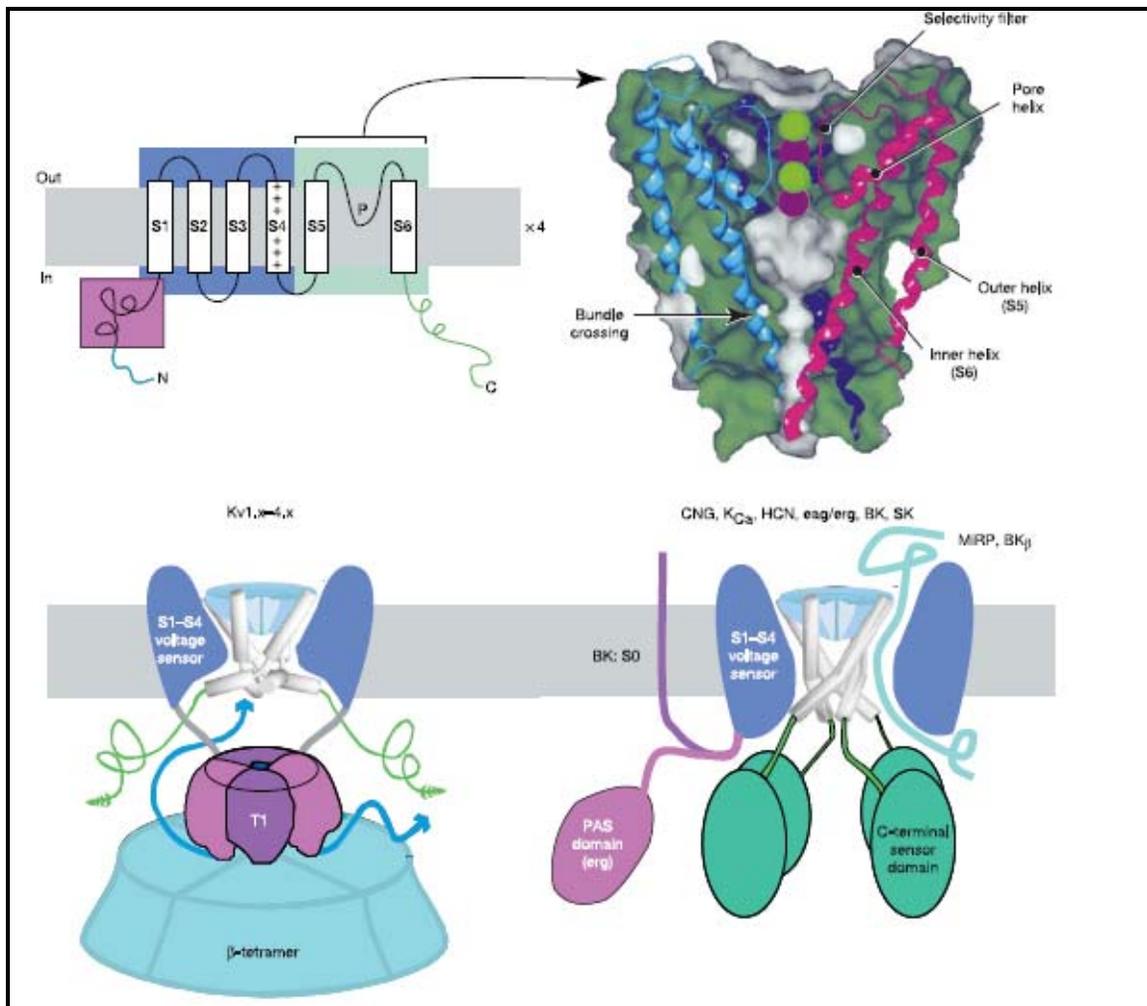
La nomenclatura estandarizada de los canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv) en la que se basaron las nomenclaturas para los canales de Na^+ y Ca^{2+} , se adoptó hace 15 años⁴⁶. Está basada en la relación filogenética entre los canales que compartían un 65% de la secuencia de aminoácidos si pertenecían a una subfamilia. Se crearon varias subfamilias (Kv1-Kv6). A medida que se descubrían nuevos genes se saltaron el Kv7 y se les asignó con Kv8 y Kv9. Más recientemente, también se han descubierto los genes KCNH y el KCNQ, y todavía no se han incluido en la clasificación de los canales Kv. Al igual que con el resto de nomenclaturas los canales de potasio tienen nomenclatura HUGO que se refiere a los genes que codifican las subfamilias, siendo Kv2 = KCNB o Kv3 = KCNC, y así sucesivamente⁴⁷.

Figura 3. Representación esquemática de una subunidad del canal Kv1.1
(según Zuberi *et al.*, 1999⁴⁸)



Los canales de potasio Kv suelen estar cerrados cuando el potencial de membrana está descansando. Están formados por 4 subunidades α homólogas. Cada subunidad contiene 6 segmentos transmembrana. Uno de los segmentos transmembrana tiene unos aminoácidos cargados muy positivamente, que causan el cambio conformacional sobre la despolarización de la membrana. Las dimensiones físicas del poro, dan al canal la posibilidad de ser permeable a los iones de potasio. El genoma humano contiene un total de 16 subunidades de genes α para los canales Kv. En el cerebro de los mamíferos, la expresión de muchos de estos canales Kv está restringida a las neuronas, aunque las células gliales pueden expresar unos subtipos específicos. Además de la composición de las subunidades α y β , existen unidades accesorias para los canales Kv4 que están codificadas por dos tipos de proteínas, unas de ellas son proteínas que se unen al calcio (KChIP) funcionando como sensores del ion calcio. Además, de las típicas subunidades auxiliares, existen en el genoma un número de unidades “eléctricamente silentes”, de las que aún se desconoce su función exacta⁴⁹.

Figura 4. Estructura de diferentes canales de potasio dependientes de voltaje
(según Yellen, 2002 ⁵⁰)



El típico canal de potasio dependiente de voltaje bacteriano es un conjunto de 4 dominios transmembrana idénticos que rodean un poro central, situado en la zona superior izquierda de la imagen. Cada subunidad tiene 6 cruces transmembrana (S1-S6) con terminales N- y C- en la zona intracelular de la membrana. La zona más estrecha del poro, el filtro de selectividad, está formado por un bucle entre S5 y S6, el sensor de voltaje incluye la región S4 con sus múltiples cargas positivas. En la zona superior derecha de la imagen se muestra el dominio del canal que forma el poro. Sólo tiene dos helices transmembrana (S5 y S6). La proteína interna rodea las helices, y en la zona superior está el filtro de selectividad. Las imágenes inferiores corresponden a canales tetraméricos, que no tienen un dominio T1, y sin embargo tienen un dominio sensor en la terminal C.

Tabla 4. Tipos de canales de potasio: nomenclatura y localización en el SNC (según Trimmer y Rhodes, 2004)

Tipo Canal Potasio (Kv)	Subtipo Kv	Tipo celular	Localización cerebral
Kv1	<i>Kv 1.1</i>	Cuerpos neuronales, axones y terminaciones nerviosas 1) Células en cesto cerebelosas 2) Membrana juxtapanodal adyacente a los nódulos de Ranvier	Aferentes estriados en globo pálido y parte reticular de la sustancia negra Capa molecular y giro dentado
	<i>Kv 1.2</i>	Cuerpos neuronales, axones y terminaciones nerviosas 1) Células en cesto cerebelosas 2) Membrana juxtapanodal adyacente a los nódulos de Ranvier	Capa molecular y giro dentado
	<i>Kv 1.4</i>	Cuerpos neuronales, axones	Aferentes estriados en globo pálido y parte reticular sustancia negra Capa molecular
	<i>Kv.16</i>	Interneuronas	
	<i>Kv 1.3</i>	Fibras paralelas de axones de las células granulosas cerebelosas	Cortex cerebeloso
	<i>Kv 1.5</i>	Células gliales	
	<i>Kv 1.7</i>		Musc. Esquelético, corazón, islotes pancreáticos
Kv2	<i>Kv 2.1</i>	Zona somatodendrítica: axones y terminaciones nerviosas Astrocitos (subcelular)	Distribución general del cerebro: -Cortex: céls. piramidales (capas II/III & V) - Hipocampo
	<i>Kv 2.2</i>	Dendritas	Neuronas corticales piramidales Neuronas bulbo olfatorio
Kv3 (activación rápida, neuronas con potenciales continuados rápidos)		Interneuronas Neuronas	Hipocampo y neocortex Neuronas auditivas
	<i>Kv 3.1</i>		Cortex e hipocampo
	<i>Kv 3.2</i>		Cortex e hipocampo
	<i>Kv 3.3</i>	Células Purkinje	Cortex cerebeloso
Kv4	<i>Kv 4.1</i>		(baja concentración en cerebro)
	<i>Kv 4.2</i>	Cuerpos neuronales	Hipocampo y células granulares del dentado
	<i>Kv 4.3</i>	Interneuronas	Hipocampo y células granulares del dentado

2. Concepto de canalopatía

Antes de 1982, el conocimiento sobre la función de los iones en la actividad eléctrica en las paredes de las células estaba limitado a sistemas de modelos. Estaba basado en el trabajo desarrollado por Hodgkin, Huxley y Cole, entre otros, que nos revelaron el principio iónico de la excitación nerviosa en el axón del calamar gigante⁵¹. La unión entre los mecanismos de los modelos animales utilizados y la fisiología humana se quebró en 1982, cuando se clonó el primer canal iónico, la subunidad α del receptor de la acetilcolina. La biología molecular nos ha permitido identificar los genes que conforman los canales iónicos. La unión entre la ciencia básica y la medicina clínica ha llegado a través del descubrimiento de la presencia de enfermedades humanas ligadas a mutaciones en genes que codifican para subunidades de canales iónicos o proteínas que las regulan: las canalopatías.

Canalopatía es el término que se ha acuñado para describir las enfermedades relacionadas con las mutaciones de los genes que regulan los canales iónicos celulares. Sin duda, la mejor comprensión de la existencia de las canalopatías nos ha ayudado a entender mecanismos fisiopatológicos celulares que antes nos eran desconocidos⁵². El concepto de canalopatía es introducido por Alfred L. George Jr. con una amplia discusión sobre el impacto de las mutaciones de los canales de sodio dependientes de voltaje en diferentes patologías⁵³. Las mutaciones de los canales iónicos que se han descubierto son generalmente aquellas que están asociadas a fenotipos característicos, especialmente aquellos transmitidos de forma autosómica dominante con alta penetrancia. Los estudios funcionales caracterizan los canales iónicos mutados de tres maneras: (1) las alteraciones que se producen en el canal tienden a producir una despolarización de la membrana produciendo una ganancia o pérdida de función, las mutaciones de los canales de K^+ suelen ser mutaciones con pérdida

de función, mientras que las que afectan a los canales de Na^+ suelen producir una ganancia de la función. (2) Los canales mutantes que expresan y forman canales funcionales, afectan más a la entrada/salida de la célula que a la permeabilidad. (3) Los cambios funcionales en el comportamiento del canal mutante suelen ser sutiles, algo que contribuye a la naturaleza paroxística y episódica de los síntomas clínicos de estos trastornos. La susceptibilidad para la disrupción de la excitabilidad celular está aumentada por estos cambios leves, pero se necesita un desencadenante ambiental como un cambio de temperatura o la fluctuación de la concentración iónica, para que se manifiesten dichos síntomas clínicos⁵⁴. Aquellas mutaciones que producen cambios muy graves, no suelen ser toleradas, siendo incompatibles con la vida. La función de los canales no sólo puede afectarse por causas genéticas, sino que los trastornos adquiridos son una fuente importante de síndromes neurológicos. Se comentarán las canalopatías relacionadas con los canales dependientes de voltaje de sodio, calcio y potasio.

3. Tipos de canalopatías

Se pueden dividir según el canal afectado, el tejido o sistema donde se manifiestan y, en si son hereditarias o adquiridas. Se desglosarán con más detalle las canalopatías del SNC, que a diferencia del músculo, es difícil poder relacionar directamente el defecto funcional del canal mutado con una alteración específica en la actividad neuronal o incluso con la manifestación clínica del fenotipo (incluso retrospectivamente). Sin embargo, el descubrimiento de las mutaciones en los canales iónicos del SNC es un paso importante para mejorar nuestro conocimiento sobre estas patologías e intentar desarrollar estrategias terapéuticas más eficaces.

a. Canalopatías de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav)

El estudio de las canalopatías se originó por una mejor comprensión de la estructura y función de los canales de sodio. Los canales de sodio se abren en respuesta a la despolarización de la membrana y, mientras están abiertos, favorecen una vía de flujo hacia el interior celular de iones de sodio. Son los canales que predominan como mediadores de la transmisión neuromuscular. Esto resulta en un proceso regenerativo que es necesario para la conducción de impulsos eléctricos en el nervio y músculo. Unos milisegundos tras su apertura, la mayoría de los canales de sodio dependientes de voltaje entran en un estado inactivado. Esta transición rápida entre el estado activado y el inactivado es fundamental para controlar la duración de los impulsos eléctricos en todos los tejidos. Las mutaciones en los genes que codifican los canales de sodio causan hasta 20 tipos de trastornos clínicos. El análisis de las enfermedades del músculo esquelético identificó algunas de las primeras canalopatías asociadas con mutaciones que modifican la inactivación del canal de sodio. En la canalopatía del canal de sodio del músculo que cursa como una miotonía existe una alteración del canal que afecta la inactivación del mismo, siendo ésta lenta o incompleta. Esto da lugar a una hiperexcitabilidad, estimulación muscular repetitiva y fatiga (ver Tabla 5)⁵⁵.

Canalopatías Nav Hereditarias

La activación de los canales de sodio dependientes de voltaje causa un aumento del potencial de acción que provoca una serie de eventos fisiológicos como las descargas neuronales y la contracción muscular. Existen aproximadamente 20 trastornos diferentes (ver Tabla 5) que afectan a diferentes sistemas: músculo, corazón y sistema nervioso periférico y central. Se comentarán brevemente las canalopatías musculares y las del SNC, dado que estos dos órganos son los que más van a estudiarse posteriormente en este trabajo. Además, el músculo esquelético fue el primer tejido donde se describieron trastornos hereditarios

asociados a alteraciones en canales iónicos⁵⁶. El mejor conocimiento de las consecuencias funcionales de estas mutaciones en sistemas de expresión heterólogos ayuda a avanzar en abordajes terapéuticos basados en estas mutaciones y en los mecanismos funcionales comunes en patologías tan diversas como la parálisis periódica y la epilepsia.

Canalopatías Nav Musculares

Las alteraciones en la función del músculo de los canales de sodio dependientes de voltaje puede afectar la habilidad del músculo esquelético para contraerse o relajarse. La mayoría se manifiesta con síntomas similares: ataques episódicos de minutos a días de duración que muestran una remisión espontánea o completa. La miotonía y la parálisis periódica son dos de los síntomas típicos de la disfunción del sarcolema⁵⁷. La **miotonía** se caracteriza por un retraso en la relajación del músculo tras una contracción súbita y brusca asociada con potenciales de acción repetitivos, que manifiesta una hiperexcitabilidad de la membrana muscular⁵⁸. Esto mismo ocurre en la paramiotonía, es decir, la presencia de potenciales de acción repetitivos y no controlados del sarcolema tras una activación voluntaria del músculo. La miotonía puede ser debida a mutaciones en canales del cloro o mutaciones en el Nav, causando trastornos algo diferentes. Profundizando en las mutaciones que afectan al canal de sodio, éstas suelen localizarse en el canal Nav1.4 provocando una alteración del mismo que desestabiliza el estado inactivado del canal, dando lugar a una inactivación lenta o incompleta. Tienen un patrón hereditario autosómico dominante. Esto resulta en una tendencia aumentada de las fibras musculares a despolarizarse, que genera potenciales de acción repetitivos (miotonía). Hay tres tipos clínicos, con fenotipos clínicos y gravedades diferentes: (a) miotonía fluctuante, trastorno leve donde los pacientes puede que ni sean conscientes que lo sufren; (b) miotonía con respuesta a acetazolamida; y (c) miotonía permanente, donde la miotonía continua eléctrica da lugar a una hipertrofia muscular generalizada. La **paramiotonía congénita** tiene como síntoma

principal la miotonía. A diferencia de la miotonía que mejora con el ejercicio y el calor, la paramiotonía empeora con el frío y el post-ejercicio.

Tabla 5. Trastornos hereditarios asociados a los canales de sodio dependientes de voltaje
(según George, 2005)

Tipos de Canalopatías de Nav	Disfunción	Trastorno Hereditario
Gen afectado (cromosoma)		
Musculares		
SCN4A (crom 17)	Disminución de la inactivación y de la velocidad de recuperación del canal Alarga el potencial de acción	<ul style="list-style-type: none"> • Parálisis Periódica Hipercalemiémica • Paramiotonía congénita • Miotonía agravada por potasio • Miotonía congénita dolorosa • Síndromes miasténicos congénitos • Parálisis hipocaliémica periódica tipo 2
SNP (Sistema Nervioso Periférico) SCN9A		<ul style="list-style-type: none"> • Eritremalgia primaria familiar
SNC (Sistema Nervioso Central)		
SCN1A (2q24)	Flujo de sodio somatodendrítico	<ul style="list-style-type: none"> • Epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+) • Epilepsia mioclónica severa de la infancia (Síndrome de Dravet) • Epilepsia intratable de la infancia con convulsiones frecuentes tónico-clónicas generalizadas • Convulsiones neonatales familiares benignas
SCN2A (2q23-q 24.3)	Flujo axonal (potencial acción y propagación)	
SCN1B (19q13.1)	Modula acción subunidades α	
Cardíacas		
SCN5A (crom 3)	Susceptibilidad a arritmia ventricular y a una alteración de la conductividad cardíaca Tendencia a la presencia de bradicardia durante el descanso y sueño	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome congénito del QT largo (Romano-Ward) • Fibrilación ventricular idiopática (Síndrome Brugada) • Enfermedad aislada del sistema de la conducción cardíaca • Parada auricular • Síndrome del seno enfermo congénito • Síndrome de la muerte súbita • Miocardiopatía dilatada, trastornos de la conducción, arritmia

La **parálisis periódica** representa un estado transitorio de hipoexcitabilidad o inexcitabilidad en el que los potenciales de acción no pueden ser generados ni propagados. Los síntomas ocurren episódicamente, dado que los defectos de los canales iónicos suelen estar bien compensados. Se distinguen dos tipos de debilidades con o sin miotonía según el nivel de potasio sérico durante los ataques de tetraplejía: parálisis periódica **hipercaliémica** o **hipocaliémica**. Estudios electrofisiológicos in vivo⁵⁹ demostraron que la miotonía agravada por potasio, la paramiotonía congénita y la parálisis periódica hiper e hipocaliémica están asociadas con una conductibilidad anormal del sodio de la membrana muscular, señalando el gen SCN4A como el candidato más plausible para la mutación. Esto se confirmó con estudios de ligamiento genético⁶⁰, observándose pues en un 70% de pacientes que se trata de mutaciones sin sentido en el SCN4A, que afectan al subtipo de canal Nav1.4 (un 20% de pacientes no tienen una mutación identificada). Los pacientes con una mutación en el SCN4A pueden presentar de forma esporádica reacciones miotónicas malignas en presencia de succinilcolina⁶¹, que se parecen a la sensibilidad a sufrir un síndrome de hipertermia maligna. Se han caracterizado las propiedades biofísicas de los canales de sodio dependientes de voltaje en estado normal y patológico. Estos estudios demuestran que existen defectos variables de la inactivación en casi todos los casos. Así que los canales mutados ejercen un efecto indirecto negativo dominante sobre los canales normales en estos pacientes⁶². El tratamiento farmacológico de las parálisis periódicas con inhibidores de la anhidrasa carbónica suele tener éxito, aunque el mecanismo de acción no se acaba de comprender todavía⁶³. Estos fármacos son eficaces por ser capaces de interrumpir los potenciales de acción a través de la acción inhibitoria de los canales de sodio. Otros tratamientos utilizados son la mexiletina⁶⁴ y la flecainida⁶⁵.

Los **síndromes miasténicos congénitos** son un grupo de trastornos hereditarios caracterizados por una transmisión defectuosa de la excitación

neuromuscular que resulta en fatiga muscular. Debuta desde los primeros años de vida; habitualmente son debidos a canalopatías en el receptor de acetilcolina. Resultan de defectos en las proteínas presinápticas, sinápticas y post-sinápticas. El defecto presináptico reduce la liberación de acetilcolina y la resíntesis por mutaciones en la acetilcolintransferasa. El defecto sináptico está causado por un déficit en la acetilcolinesterasa por mutaciones en la unidad que media la inserción de la acetilcolina en la lámina basal. El defecto post-sináptico está causado por mutaciones dominantes o recesivas en una de las subunidades del receptor nicotínico de acetilcolina o en proteínas que anclan los receptores de acetilcolina a la membrana, como las mutaciones de rapsina⁶⁶. En la transmisión neuromuscular, la activación de los receptores AcCol da lugar a un potencial de placa motora terminal que activa el canal de sodio dependiente de voltaje (Nav1.4). Se ha descrito un tipo de síndrome miasténico congénito en el que se ha demostrado que no se activa el canal Nav1.4, encontrándose una mutación de SCN4A que potencia la inactivación rápida del Nav1.4⁶⁷.

Canalopatías Nav del SNC

Los canales de sodio dependientes de voltaje son fundamentales para la generación y propagación de los potenciales de acción en el sistema nervioso periférico y central. La mayoría de los 13 genes que codifican las subunidades α / β se expresan en el cerebro, nervios periféricos o ambos. Además, de su función fisiológica, los canales de sodio sirven como diana para agentes terapéuticos como los fármacos antiepilépticos y anestésicos locales⁶⁸. Defectos genéticos en genes que codifican dos subunidades que forman los poros α (SCN1A y SCN2A) y la subunidad accesoria $\beta 1$ (SCN1B) son responsables del desarrollo de un grupo de síndromes epilépticos, que tienen características clínicas similares pero gravedad diferente. Los tipos de síndromes que pueden ocurrir se mencionan en la tabla donde se especifican los trastornos relacionados con este tipo de enfermedades (ver Tabla 5)⁶⁹. La primera mutación de un canal de sodio dependiente de voltaje, asociada a un síndrome

epiléptico hereditario, la **epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus**, se descubrió en el gen SCN1B que codifica la subunidad accesoria $\beta 1$ ⁷⁰. Sin embargo, las mutaciones en este gen se han asociado en pocas ocasiones con una epilepsia hereditaria. Sólo se han descrito dos mutaciones en el SCN1B: una mutación sin sentido (C121W) y una delección del 5-aminoácido⁷¹. Ambas mutaciones ocurren en un dominio extracelular importante en la modulación funcional de las subunidades α del canal y que media interacciones de proteína a proteína críticas para la localización subcelular del canal Nav en las neuronas. La **epilepsia mioclónica severa de la infancia** se basa en un diagnóstico clínico, que incluye: aparición de crisis, alteración psicomotora tras el inicio de las crisis, presencia de crisis mioclónicas, ataxia y resistencia al tratamiento con antiepilépticos. La **epilepsia intratable de la infancia con crisis tónico-clónicas generalizadas** y las **convulsiones neonatales familiares benignas** se parecen mucho a nivel clínico y genético a la epilepsia mioclónica de la infancia. Se han descubierto mutaciones hereditarias en los tres genes mencionados e incluso en un receptor GABAérgico. En total se han hallado más de 100 mutaciones, siendo sin sentido mayoritariamente en la epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus, y siendo deletéreas en la epilepsia intratable de la infancia con convulsiones frecuentes tónico-clónicas generalizadas. Mutaciones en el gen SCN2A también se han asociado con las convulsiones neonatales familiares benignas. Al existir tantos fenotipos que se solapan y etiologías moleculares compartidas entre los diferentes tipos de epilepsias hereditarias ligadas a mutaciones del gen SCN1A, se puede sugerir que esto refleja un continuum de trastornos clínicos por alteraciones en el Nav.

Canalopatías Nav Adquiridas

La mayoría de las canalopatías de los canales de sodio son hereditarias, aunque existen algunas adquiridas. La desregulación de la expresión del canal de sodio dependiente de voltaje por alteraciones en la actividad de los genes no mutados, produce las canalopatías adquiridas⁷². En estos casos, la estructura proteica del

canal no es anormal genéticamente, sino que cierta inactiva hace que disfuncione (trastornos paraneoplásicos, autoinmunes, post-traumáticas, etc.).

Un tipo de canalopatía de sodio adquirida es la que ocurre en la lesión de nervio periférico dando lugar a parestesias y dolor neuropático. Tras una lesión axonal se producen unas descargas de alta frecuencia con una despolarización lenta⁷³. Parece que la evidencia actual afirma que el daño axonal puede desencadenar la expresión no regulada de genes de los canales de sodio que contribuye a la excitabilidad anormal de las neuronas del ganglio del asta dorsal medular, tanto en modelos animales como en tejido humano. Los primeros indicios que la alteración de la actividad de los canales de sodio podía contribuir a la presencia de una hiperexcitabilidad de los nervios lesionados vinieron de estudios neurofisiológicos. Los registros intra-axonales de nervios previamente seccionados y que se habían regenerado, demostraban que aparecía una actividad anormalmente lenta debido a una despolarización lenta sin actividad sináptica. Aunque, en un principio, no se podía distinguir si esta actividad era por la presencia de canales de sodio con una función anormal preexistentes, o por la existencia de canales de nueva expresión. La respuesta vino gracias a estudios moleculares y biofísicos. La lesión del nervio periférico experimental desencadena el que se “apaguen” unos canales de sodio activos, para que empiecen a funcionar unos genes de otros canales de sodio previamente silentes (que habitualmente en el caso del nervio periférico están localizados en el asta dorsal medular). Además de estos cambios en la expresión génica, las corrientes de sodio producidas por los canales de sodio específicos de las neuronas sensitivas están atenuadas; y una corriente de sodio que se recupera rápidamente de la inactivación del canal, emerge en las neuronas axotomizadas. Este mismo fenómeno se ha descrito en el modelo de constricción crónica de lesión de nervio. Por lo tanto, se puede concluir de estas observaciones que, los patrones alterados de la activación de los genes de los canales de sodio secundarios a lesión, participan en la generación del dolor neuropático. Esto se

ha demostrado no sólo en un modelo animal sino también mediante inmunocitoquímica en humanos, estudiando la expresión de canales de sodio en neuronas del asta dorsal lesionadas. Por lo tanto, el daño axonal puede desencadenar una desregulación de la expresión de los genes que codifican los canales de sodio⁷⁴.

En la esclerosis múltiple, ocurren cambios de mala adaptación caracterizados por la desregulación de la expresión de los canales iónicos. Actualmente, empieza a existir evidencia que en la esclerosis múltiple una canalopatía adquirida podría contribuir a la ataxia. Los canales de sodio están distribuidos de forma no uniforme en la membrana del axón mielinizado, con una mayor densidad en la membrana alrededor del nódulo de Ranvier. El bloqueo de la conducción ocurre parcialmente porque la desmielinización expone la membrana del canal de sodio que permite el paso de la corriente. Aunque en los axones desmielinizados de forma crónica se produce una reorganización de la membrana no mielinizada, que desarrolla más densidad de canales de sodio⁷⁵.

b. Canalopatías de los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav)

Las canalopatías de los canales de calcio pueden afectar al músculo esquelético o al sistema nervioso central (ver Tabla 6). Se van a explicar más detalladamente las que afectan al SNC. Las enfermedades que se originan de mutaciones en los genes de canales iónicos de calcio que afectan al sistema nervioso central normalmente resultan en trastornos paroxísticos con crisis transitorias y episódicas en la función cerebral como la epilepsia, la migraña o la ataxia episódica.

Tabla 6. Tipos y localización de las canalopatías de los canales de calcio dependientes de voltaje descritas en humanos (según McKeown *et al.*, 2006 ⁷⁶)

Canal (subunidad α)	Gen/Locus	Localización	Características Funcionales	Patología
Cav1.1 (a1_s)	CACNA1S/ 1q31_32	Músculo esquelético – tubulos transversos	Excitación/ contracción músculo	a) Parálisis periódica hipocaliémica b) Susceptibilidad hipertermia maligna
Cav1.2 (a1_c)	CACNA1C/ 12p13.3	Miocitos cardiacos, células endocrinas, cuerpos neuronales y dendritas proximales en cortex e hipocampo	-Excitación/ contracción músculo -Secreción hormonas -Propagación potencial acción cardíaco	Síndrome de Timothy: sindactilia, inmunodeficiencia, síndrome QT largo y arritmias ventriculares (afectación desarrollo cardíaco)
Cav1.4 (a1_F)	CACNA1F/ Xp11.4	Retina (bastones y células bipolares)	Neurotransmisión de fotoreceptores	a) Ceguera nocturna congénita tipo 2 ligada al X. b) Esquizofrenia?
Cav2.1 (a1_A)	CACNA1A/ 19p13	Terminaciones presinápticas nerviosas y dendritas en la capa molecular y células Purkinje del cerebelo	Liberación neurotransmisores (sinápsis excitatorias)	a) Ataxia episódica tipo 2 (AE2) b) Migraña hemipléjica familiar (MHF) c) Ataxia espinoocerebelosa tipo 6 (SCA6) d) Epilepsia generalizada idiopática

La tabla resume la relación entre la función y patología de las diferentes mutaciones de la subunidad α de los Cav. Sólo se muestran las mutaciones que se han identificado en humanos. Es cierto, que algunas de las patologías mencionadas para el mismo canal, se pueden solapar. **Se señalan en negrita aquellas que afectan al SNC.**

La **susceptibilidad a la hipertermia maligna** es una predisposición autosómica dominante a responder de forma anormal a anestésicos volátiles, relajantes musculares o calor ambiental, provocándose un aumento del calcio mioplásmico que provoca un aumento del metabolismo muscular y de la producción de calor. Esto de lugar a contracturas musculares, hipertermia con acidosis metabólica,

hipercaliemia e hipoxia. Esto es debido a mutaciones en la subunidad α del canal de calcio tipo L, aunque también se han descrito mutaciones en el receptor muscular de la rianodina, que es un canal de calcio no dependiente de voltaje.

La ceguera nocturna congénita ligada al cromosoma X es un trastorno recesivo no progresivo de la retina, que se caracteriza por ceguera nocturna, reducción de la visión diurna, disminución de la agudeza visual, miopía, nistagmo y estrabismo. Se cree que es resultado de una disminución en la efectividad de la transmisión sináptica entre fotorreceptores y neuronas de segundo orden de la retina. Se han propuesto dos entidades clínicas diferenciadas: la ceguera nocturna congénita completa e incompleta. Los loci se han mapeado respectivamente en los cromosomas Xp11.4 y Xp1.23. El gen CACNA1F codifica la subunidad $\alpha_{1.4}$ y también se localiza en el cromosoma Xp1.23⁷⁷. Los canales Cav1.4 se expresan en la retina y median corrientes de calcio de tipo L. Se han identificado hasta 20 mutaciones relacionadas a la ceguera nocturna congénita. Aunque 14 son sin sentido, puede ser que sean funcionales, puesto que, en principio, las proteínas mutantes truncadas no deben poder formar otro canal, esto todavía no se ha demostrado. Dado que los canales tipo L controlan la liberación de neurotransmisores de las terminaciones presinápticas de los fotorreceptores, las mutaciones con pérdida de función en estos canales presinápticos disminuiría el flujo hacia el interior de calcio y la liberación tónica de glutamato en la oscuridad, dando lugar a una despolarización relativa de las células bipolares.

Canalopatías del Cav2.1 (canal tipo P/Q)

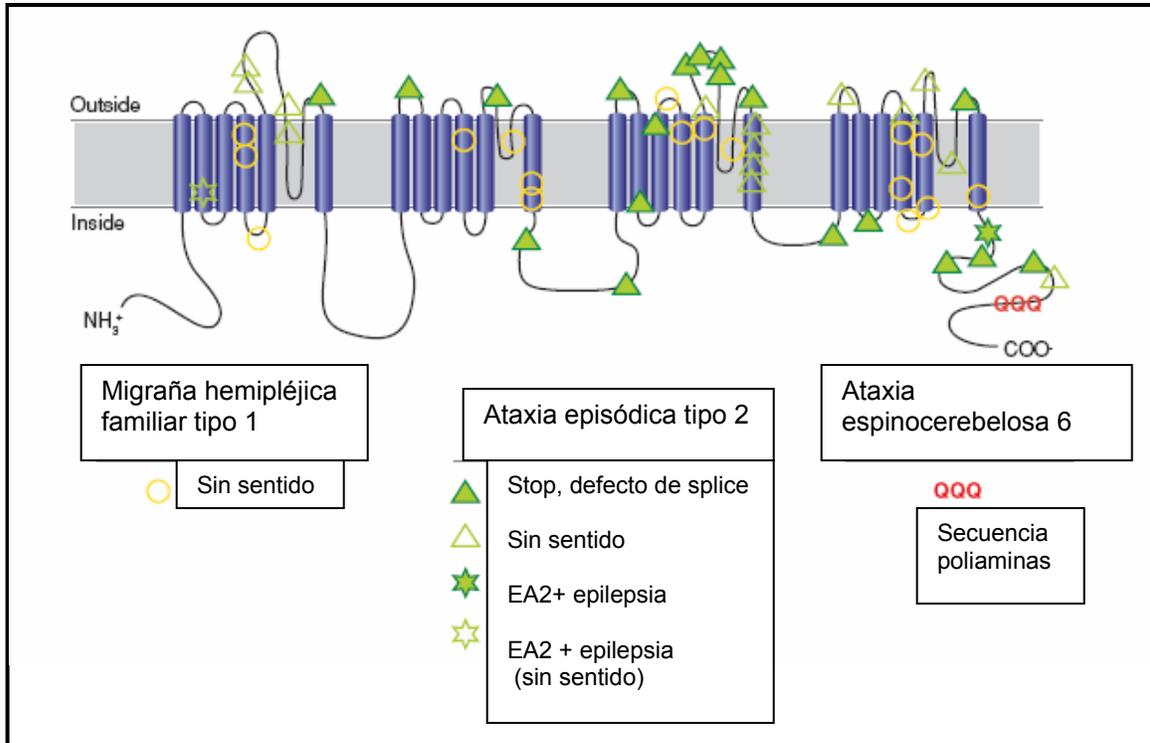
Se postula que los diferentes fenotipos asociados a defectos en el CACNA1A, (cromosoma 19q13)⁷⁸, surgen de las consecuencias funcionales características de los diferentes tipos de defectos genéticos y los requerimientos varios de la corriente tipo P/Q en las diferentes poblaciones neuronales. La correlación entre genotipo y fenotipo de estos trastornos alélicos ha llevado a la propuesta de que

la gravedad clínica, que proporcionalmente aumenta con la lesión molecular del CACNA1A (mutación sin sentido, truncamiento, expansión CAG), resulta en un espectro clínico proporcional al tipo de mutación (ver Figura 5).

Migraña hemipléjica familiar tipo 1 (MHF tipo 1): la migraña es un trastorno neurológico frecuente y heterogéneo caracterizado por la presencia de ataques episódicos consistentes en: cefalea unilateral, pulsátil, de intensidad moderada-grave, que se asocia a foto y sonofobia, náuseas y vómitos. En un 15% de los pacientes los ataques se preceden de anomalías neurológicas transitorias (visuales, sensitivas, del lenguaje) denominadas aura. Gracias a estudios de gemelos y familiares, se ha visto que se trata de una enfermedad multifactorial poligénica. La migraña hemipléjica familiar tipo 1 consiste en un trastorno poco frecuente, episódico que se caracteriza por ataques de migraña con aura seguidos de una hemiparesia o hemiplejía de días de duración. Algunos pacientes desarrollan a lo largo de la vida ataxia y nistagmo. Se ha identificado una mutación en el cromosoma 19p13, en aproximadamente un 50% de las familias. En el resto de familias con MHF se han identificado otras mutaciones en otros cromosomas, pasando a denominarse MHF tipo II o III. El gen CACNA1A está en el cromosoma 19p13 y codifica el canal de calcio Cav2.1 que es un canal tipo P/Q. La mutación se ha estudiado en animales, mostrando que en ratones: (1) sobre un conjunto de despolarizaciones leves, la densidad de la corriente en las células granulares cerebelosas y en las neuronas corticales piramidales era mayor; en las despolarizaciones intensas, las corrientes se asemejaban, sugiriendo que predomina un traslado hacía la activación neuronal, sin una reducción de la expresión del canal mutante en la membrana; (2) la neurotransmisión se incrementó en la unión neuromuscular, y la liberación del glutamato cortical se potenció; y (3) el umbral para desencadenar la depresión cortical propagada por el córtex (que clínicamente se refleja con el aura migrañosa) era más bajo y la velocidad de propagación era mayor⁷⁹. Dada la existencia de varias mutaciones conocidas del canal en la MHF (expresión de

subunidades $\alpha_{1.2.1}$ o subunidades accesorias), éstas pueden afectar de forma diferente al flujo de calcio que pasa por los canales P/Q en las diferentes neuronas, e incluso dentro de la misma neurona.

Figura 5. Trastornos alélicos del canal de calcio tipo Cav2.1 (según Cannon, 2006)



En el diagrama se muestra la estructura del Cav2.1, reflejándose la localización relativa de las mutaciones asociadas con la MHF tipo 1, la AE tipo 2 y la AE tipo 6.

La **ataxia episódica tipo 2** (AE-2) es un trastorno poco frecuente, autosómico dominante, que cursa con episodios (de horas a días de duración) de ataxia, nistagmo, vértigo y disartria que pueden precipitarse por el estrés o el cansancio y que mejoran con la administración de acetazolamida. La AE-2 además se asocia a nistagmus interictalmente. La prevalencia de que se acompañe de migrañas es de un 50%. Muchos pacientes desarrollan una ataxia cerebelosa que se correlaciona con una atrofia cerebelosa en el vermis anterior. Existe variabilidad intra e interfamiliar. La AE-2 se ha localizado en el mismo gen

CACNA1A, que la MHF. La mayoría de las mutaciones conocidas, disrumpan de diferentes maneras el producto génico final. La mutación más agresiva es la que da lugar a una AE-2 con ataxia progresiva y degeneración cerebelosa, puesto que provoca una pérdida de función total del canal Cav2.1, sin afectar la expresión del mismo⁸⁰. Como es poco probable que la subunidad truncada $\alpha 1$, generada por otras mutaciones en la AE-2, forme canales funcionales, probablemente, la pérdida de función del canal Cav2.1 sea el mecanismo que subyace en este tipo de ataxia. Estudios de expresión de las mutaciones sin sentido de la AE-2 han documentado una ausencia completa de corriente detectable, a pesar de la presencia de la proteína Cav2.1 o una reducción en la amplitud de la corriente, como la que se observa en la AE-2 que se asocia a la epilepsia generalizada idiopática y a crisis de ausencia, que están causadas también por una mutación del CACNA1A⁸¹. La alteración de la neurotransmisión muscular, también apoya este posible mecanismo fisiopatológico. Aunque los pacientes no manifiestan una debilidad muscular clínica, estudios electromiográficos sí que muestran un aumento de la varianza en el retraso entre potenciales de acción en dos fibras musculares; y en la contracción muscular, la entrada de calcio en el miocito se realiza a través del canal Cav2.1, permitiendo la liberación de acetilcolina.

La **ataxia espinocerebelosa tipo 6 (AEC-6)** pertenece a un grupo diverso de ataxias cerebelosas, que son trastornos neurodegenerativos, hereditarios, autosómicos dominantes caracterizados clínicamente por disfunción cerebelosa (ataxia, disartria, nistagmo) y atrofia cerebelosa (sobretudo hay una pérdida de células de Purkinje, más que de células granulares). Esto da lugar a un síndrome atáxico progresivo que se inicia con dificultades en la coordinación y que acaba con una imposibilidad para deambular. Ocurren como una enfermedad aislada y pueden combinarse con la afectación de otros sistemas neuronales (neuropatía periférica, distonía, retinopatía). La edad de inicio es la cuarta década de la vida,

la progresión de la enfermedad es lenta. La ataxia espinocerebelosa tipo 6 se produce por expansiones de repeticiones del trinucleótido CAG, que codifica una secuencia de poliglutaminas en el extremo carboxilo del Cav2.1⁸². Los pacientes con AEC-6 presentan entre 21-30 repeticiones, mientras que aquellos sin el síndrome atáxico tienen de 6-17. Contra más repeticiones de poliglutaminas, mayor precocidad de inicio de la enfermedad⁸³. A diferencia de otras enfermedades que cursan con repeticiones del CAG, no hay evidencia de que exista una expansión inestable de la repetición CAG o empeoramiento del fenotipo en sucesivas generaciones. En algunos pacientes diagnosticados de AEC-6, se han observado brotes episódicos, e incluso en una familia con AE-2 se observó una expansión CAG pequeña, lo que lleva a pensar que la AE-2 y la AEC-6 son un continuum clínico de la misma enfermedad⁸⁴. Hay evidencias indirectas que la degeneración neuronal selectiva en la EA-6 pueda estar asociada a la agregación de la proteína α_1A , que indicaría una expresión reducida de dicha proteína. La expansión de poliglutamina altera las propiedades biofísicas de canales Cav2.1 expresados de forma heterogénea, aunque la afectación es mayor en humanos donde se observa una traslación en la dependencia al voltaje de los canales Cav2.1.

c. Canalopatías de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv)

Los canales de potasio son genéticamente muy diferentes. Desde el primer canal de potasio clonado de la *Drosophila melanogaster*, se han identificado más de 100 canales de K^+ . Los canales pueden ganar o perder su función según las mutaciones en las regiones del gen que codifica la subunidad principal y subunidades accesorias. En la Tabla 7, se desglosan las mutaciones conocidas en canales de K^+ que dan lugar a patología en el SNC.

Tabla 7. Canalopatías del SNC de los canales de potasio dependientes de voltaje
(según Kullmann, 2002 ; Seeböhm, 2005 ⁸⁵)

Tipo Canal Potasio (Gen/Proteína subunidad α)	Locus cromosómico	Función	Patología
KCNA 1 <i>Kv 1.1</i>	<i>12p13</i>	Repolarización axonal	Ataxia episódica tipo 1 (AE1) ± neuromiotonía y mioquimias, mayor incidencia epilepsia
KCNQ2 KCNQ2	<i>20q13.3</i>	Corriente M (bajo umbral modulada por receptores muscarínicos)	Convulsiones neonatales familiares benignas (AD) Síndrome QT largo (AD)
KCNQ3 KCNQ3	<i>8q24</i>	Corriente M (asociado a KCNQ2)	Convulsiones neonatales familiares benignas (AD)

Se señalan en negrita aquellas que afectan al SNC.

AD = autosómico dominante

La **ataxia episódica tipo 1 (AE-1)** es un trastorno poco frecuente, de herencia autosómica dominante, con episodios breves desencadenados por estrés, consistentes en ataxia y mioquimias. Los pacientes presentan mioquimias o neuromiotonía interictalmente. Se ha identificado en el cromosoma 12p13 y está asociada a mutaciones en el gen KCNA1, que codifica el canal Kv1.1⁸⁶. Se han identificado más de 10 mutaciones sin sentido y un codón de parada prematura en el carboxilo terminal. La variabilidad clínica fenotípica va desde la presencia de ataques de incoordinación cerebelosa a presencia de epilepsia, contracciones infantiles, neuromiotonía aislada y dolor muscular¹. La prevalencia de las crisis epilépticas está sobrerrepresentada lo que sugiere que las mutaciones en el canal Kv1.1 también pueden ser un factor de riesgo para la epilepsia⁸⁷. Estudios de expresión funcional han revelado la presencia de efectos mixtos. La pérdida de función se ha implicado por una supresión negativa dominante de la densidad de corriente de K⁺, la haploinsuficiencia, o la cinética acelerada de desactivación tras la hiperpolarización⁸⁸. Apoyando esta hipótesis, los ratones knock-out para el canal Kv1.1, tienen crisis epilépticas, mioquimia y ataxia⁸⁹. Inmunohistoquímicamente, el canal Kv1.1 está distribuido por todo el cerebro,

pero es especialmente prominente alrededor de los segmentos iniciales de los axones, incluyendo las neuronas piramidales en el hipocampo y las células de Purkinje en el cerebelo. Allí, los canales Kv1.1 están localizados en los terminales de axones de células cesto GABAérgicas e interneuronas de la capa de células granulares. Esta localización puede explicar una alteración en el córtex cerebeloso. Registros de las células de Purkinje de las proyecciones desde la capa granular, mostraron una mayor frecuencia y amplitud de corrientes post-sinápticas inhibitorias, sin cambios en corrientes miniaturas post-sinápticas o los índices de descarga celular. Se cree, que la reducción de la actividad del canal Kv1.1 aumenta la fidelidad de la propagación del potencial de acción en ramas de las proyecciones celulares y puede influir también en la entrada de calcio presináptico.

La **epilepsia** es un trastorno neurológico común que afecta a un 3% de la población y que se manifiesta con crisis recurrentes. La crisis resulta de descargas sincrónicas que alteran la función y circuito neurológico normal. La etiología de las mismas es múltiple: tumores, displasias, traumatismos, ictus, encefalitis o trastornos metabólicos. En hasta un 40% de los casos no se encuentra ninguna lesión subyacente, se las denomina idiopáticas. Se han identificado en la epilepsia idiopática generalizada más de 10 mutaciones en canales iónicos⁹⁰. La mayoría de las epilepsias identificadas de carácter monogénico son de herencia autosómica dominante con características clínicas propias (epilepsia nocturna del lóbulo frontal, epilepsia generalizada idiopática). En la epilepsia nocturna del lóbulo frontal, se hizo la primera asociación entre una epilepsia hereditaria familiar y el defecto en un canal iónico: receptor nicotínico de acetilcolina (nRAcCol). Aparecen crisis en forma de racimos durante el sueño no REM, con presencia de un foco frontal en el EEG. Se inicia en la primera y segunda década de la vida. Las epilepsias que se han relacionado con mutaciones en canales iónicos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 8. Síndromes epilépticos relacionados con mutaciones de canales iónicos
(según Cannon, 2006)

Gen	Canal	Síndrome
CACNA1A	Canal dependiente voltaje P/Q	Epilepsia generalizada idiopática
CHARN4	$\alpha 4$ subunidad, receptor nicotínico acetilcolina	ENLFAD
CHRN2	$\beta 2$ subunidad, receptor nicotínico acetilcolina	ENLFAD
GABRA1	$\alpha 1$ subunidad, receptor GABA _A	EMJAD
GABRG2	$\gamma 2$ subunidad, receptor GABA _A	GEFS+/CF/AI
SCN1A	α subunidad, canal Nav1.1	GEFS+/EIITCG
SCN2A	α subunidad, canal Nav1.2	GEFS+/CFNB
SCN1B	$\beta 1$ subunidad, canal Na	GEFS+
KCNQ2	KCNQ2 canal potasio	CFNB
KCNQ3	KCNQ3 canal potasio	CFNB
KCNMA1	BK canal de potasio	EGDP
CLCN2	ClC-2 canal de cloro	AI/AJ/EMJ/EGMD

ENLFAD: epilepsia nocturna lóbulo frontal autosómica dominante; EMJAD: epilepsia mioclónica juvenil autónoma; GEFS+: epilepsia generalizada con crisis febriles plus; CF: crisis febriles; AI: crisis de ausencia de la infancia; EIITCG: epilepsia intratable de la infancia con crisis generalizadas tónico-clónicas; CFNB: crisis familiares neonatales benignas; EGDP: epilepsia generalizada con disquinesia paroxística; AJ: crisis de ausencia de la juventud; EMJ: epilepsia mioclónica juvenil; EGMD: epilepsia del despertar con grand mal.

Como se puede observar en la tabla, hay tres canales de potasio que se han relacionado en la epilepsia familiar (KCNQ2, KCNQ3 y KCNMA1). Los canales KCNQ son miembros de una superfamilia de canales de K⁺ dependientes de voltaje. El canal KCNQ2 y el KCNQ3 son homólogos y se juntan para formar canales heteroméricos que conducen corriente M, que se identificó en neuronas simpáticas⁹¹. La corriente M es una corriente subumbral de K⁺ que ejerce una influencia inhibitoria en la excitabilidad neuronal, siendo a su vez inhibida por receptores de proteína G, como los receptores de acetilcolina muscarínicos. La identificación inicial de estos canales fue resultado de estudios de ligamiento directo y clonación posicional de genes en las convulsiones neonatales familiares benignas (CFNB). Esto es un trastorno poco frecuente, autosómico

dominante, que cursa con crisis tónico-clónicas multifocales que se inician en los primeros días de vida y que luego desaparecen espontáneamente tras algunos meses. El gen del síndrome de CNFB fue el primero que se mapeo con un locus mayor en 20q13.3⁹² y un locus menor en 8q24⁹³. Los trabajos de clonamiento posicional en el 20q13.3 llevaron a la identificación de un gen de un canal nuevo de potasio: KCNQ2, que se parecía al canal KCNQ1 y que se asociaba con la presencia de un síndrome de un QT largo⁹⁴. Posteriormente, se aisló el KCNQ3 en el locus 8q24. El screening genético ha identificado más de 20 mutaciones en el KCNQ2 y tres mutaciones en el KCNQ3 en las familias con CFNB⁹⁵. Las mutaciones ocurren como sustituciones sin sentido en la región del poro del canal o paradas sin sentido en la zona citoplásmica carboxilo-terminal. Esto genera canales no funcionantes. Así pues, la CFNB resulta de una forma haploinsuficiente de un alelo mutado no funcional, que reduce la densidad de corriente M, aumentando la excitabilidad neuronal. Aunque, las consecuencias de la reducción de la corriente M son menos vitales a partir de pocos meses de edad, puesto que en un 68% de los casos se resuelve espontáneamente tras las primeras 6 semanas⁹⁶. La mutación sin sentido en el canal KCNMA1, que codifica la subunidad α del canal BK, fue identificada en una amplia familia donde coexistía epilepsia (crisis de ausencia) y disquinesia paroxística⁹⁷. Todos los individuos compartían un haplotipo común que se mapeó al cromosoma 10q22. Tras estudios de expresión se ha identificado como una mutación de ganancia de función, provocando un aumento en la susceptibilidad a sufrir crisis.

II. AUTOINMUNIDAD Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

A lo largo de los últimos años, se han descrito una serie de trastornos neurológicos del sistema nervioso periférico con una base autoinmune: miastenia gravis, síndrome miasténico de Eaton-Lambert y la neuromiotonía. Además, se ha visto que existen trastornos del sistema nervioso central que parecen tener también un origen autoinmune. Para que un trastorno pueda ser considerado como autoinmune y mediado por anticuerpos tiene que cumplir una serie de criterios. Se requiere que el trastorno tenga:

- presencia de anticuerpos frente a un antígeno bien definido de superficie celular que sea relevante al proceso patológico,
- una respuesta clínica a un tratamiento inmunomodulador,
- una transmisión de la enfermedad a animales experimentales por una transferencia pasiva con inmunoglobulinas⁹⁸.

Estos criterios se cumplen en varios trastornos autoinmunes del sistema nervioso periférico (SNP). Sin embargo, en el sistema nervioso central (SNC), que normalmente está protegido por la barrera hematoencefálica (BHE) de los anticuerpos circulantes, puede ser algo más difícil obtener evidencia de la presencia de niveles de un anticuerpo para poder demostrar claramente la relación con la clínica además de poder demostrar la transferencia de anticuerpos y enfermedad al modelo animal. Por este motivo, en el sistema nervioso central, la identificación de los trastornos mediados por autoanticuerpos, se basa sobretodo, en la presencia de un anticuerpo relacionado temporalmente a la clínica del paciente y del éxito del tratamiento inmunológico.

Los anticuerpos relacionados a enfermedades neurológicas de probable o definitiva etiología autoinmune se pueden dividir en cuatro categorías:

- anticuerpos contra dianas periféricas que causan enfermedad. Están dirigidos contra la unión neuromuscular, un canal neuronal dependiente de voltaje o dependiente de ligandos;
- anticuerpos contra glicolípidos del nervio periférico, que son específicos para las glicoproteínas de la mielina o gangliósidos. Puede que tengan un efecto patogénico, pero su papel en ser el causante de la enfermedad está sólo parcialmente aceptado;
- anticuerpos contra antígenos intraneuronales del SNC, de los que también están expresados en ciertos tumores. Estos son marcadores de enfermedad, y quizá en algún caso participen en su etiopatogenia.
- anticuerpos contra antígenos de membrana del SNC, que aun no se conoce bien su papel en la etiopatogenia de la enfermedad.

Se van a desglosar los posibles trastornos autoinmunes que afectan al SNC. No se abordarán las complicaciones neurológicas de las enfermedades autoinmunes sistémicas (ver Tabla 9).

Tabla 9. Autoanticuerpos asociados con trastornos del sistema nervioso central
(según Lang *et al.*, 2003 ⁹⁹)

Trastorno	Anticuerpo	Anticuerpos en LCR	Respuesta a inmunoterapia	Tumores o infecciones asociadas
Síndromes neurológicos paraneoplásicos	<i>Ver Tabla 11</i>	Sí	Mala	CPCP, ginecológicos, mama, testicular, linfoma
Ataxia cerebelosa y gluten	Anti-TG2	No	Mala	
Encefalitis de Rasmussen	Anti-RGlu3	Variable	Mala (efecto transitorio)	
Síndrome de la persona rígida	Anti-GAD	Sí	Sí	
Ataxia cerebelosa progresiva		Sí	Raro	
Neuromielitis óptica	IgG-NMO (AQP4)	Sí	Sí	
Corea Sydenham PANDAS	Anti-ganglios basales	Sí	Mala	Infección por estreptococos
Paraparesia espástica tropical	Anti-hnRNP-A1	Sí	Sí	Infección por HTLV-1
Síndrome de Morvan	Anti-VGKC	Variable	Sí	Timoma
Encefalopatía de Hashimoto	Anti-tiroideos : Anti-microsomales, Anti-tiroglobulina	Sí	Sí	

LCR = líquido cefalorraquídeo; CPCP = cáncer de pulmón de célula pequeña; VGCC = canales de calcio dependientes de voltaje; VGKC = canales de potasio dependientes de voltaje; RGlu3 = receptor ionotrópico del glutamato tipo 3; GAD = decarboxilasa del ácido glutámico; Ig = inmunoglobulinas; ev = endovenoso; CLN3 = lipofuscinosis cerioide neuronal; LES = lupus eritematoso sistémico; AQP4 = aquaporina 4; anti-TG2 = transglutaminasa 2; hnRNP-A1 = proteína heterogénea ribonuclear A1; HTLV-1 = virus humano linfotrópico tipo 1; PANDAS = trastornos pediátricos autoinmunes neuropsiquiátricos asociados con infecciones estreptocócicas.

1. Trastornos del SNC con anticuerpos frente a un autoantígeno conocido

a. Síndromes paraneoplásicos neurológicos

Los síndromes paraneoplásicos neurológicos (SPN) son un grupo heterogéneo de síndromes neurológicos de etiología desconocida que se asocian a menudo a pacientes con cáncer. Esto es una definición que permite englobar a todo aquel síndrome neurológico que se presenta asociado a una neoplasia, sin que quizá exista la presencia de una relación patogénica¹⁰¹. El sistema nervioso puede afectarse de tres maneras: (1) el SPN puede dañar un tejido u órgano no neural que causa efectos secundarios en el sistema nervioso (ej. producción de corticotrofina –ACTH- por un tumor puede causar encefalopatía); (2) el SPN que afecta un tejido u órgano no neural puede dar lugar a una lesión estructural directa al sistema nervioso (ej. estado de hipercoagulabilidad asociado a una neoplasia puede provocar un infarto cerebral); y (3) el SPN puede afectar directamente al sistema nervioso sin implicación de otros órganos. En estos casos, se ha descubierto que estos síndromes se pueden asociar a la presencia de anticuerpos contra antígenos neuronales expresados por el tumor. A pesar de que la detección de antígenos onconeuronales ha sido muy útil en indicar la presencia de un tumor y en definir el síndrome neurológico como paraneoplásico, es cierto que no todos los SPN han de ir necesariamente asociados a un anticuerpo, por lo tanto, su presencia no debería ser lo único que definié un SPN; al igual que los anticuerpos pueden estar presentes con o sin un síndrome neurológico. Clásicamente, el término síndrome neurológico paraneoplásico en la clínica, se utilizaba cuando un paciente tenía una serie de trastornos neurológicos que suponían un desafío diagnóstico intuyendo que eran los efectos lejanos en el SNC de un cáncer sistémico; apareciendo dichos trastornos neurológicos antes del diagnóstico del cáncer puesto que en ese

momento el cáncer es tan pequeño que no se puede diagnosticar por técnicas convencionales¹⁰⁰. La detección de anticuerpos específicos frente a antígenos onconeuronales puede dirigir la búsqueda del tumor a un órgano específico.

Hay síndromes paraneoplásicos neurológicos clásicos¹⁰¹ que son aquellos síndromes que suelen estar asociados a una neoplasia; en el SNC: la encefalomielitis, la encefalitis límbica, la degeneración cerebelosa subaguda, el opsoclonus-mioclonus; en el SNP: la neuropatía sensitiva subaguda, la pseudo-obstrucción crónica gastrointestinal; en la unión neuromuscular: el síndrome miástenico de Eaton-Lambert (SMEL) y la dermatomiositis.

Tabla 10. Síndromes paraneoplásicos neurológicos clásicos y no clásicos
(según Graus *et al.*, 2004¹⁰¹)

Síndromes del SNC	Síndromes del SNP	Síndromes unión neuromuscular - músculo
<ul style="list-style-type: none"> - <u>Encefalomielitis*</u> - <u>Encefalitis límbica*</u> - Encefalitis del tronco encéfalo* - <u>Degeneración cerebelosa subaguda*</u> - <u>Opsoclonus-mioclonus*</u> - Neuritis óptica - Retinopatía asociada a cáncer* - Retinopatía asociada a melanoma* - Síndrome persona rígida* - Mielopatía necrotizante - Enfermedades de motoneurona 	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Neuropatía sensitiva subaguda*</u> - Neuropatía sensitivo-motora aguda (SGB) - Neuropatías sensitivo-motoras subagudas/crónicas - Neuropatía y paraproteinemia* - Neuropatía y vasculitis - Neuropatías autonómicas: <u>pseudo-obstrucción crónica gastrointestinal*</u> 	<ul style="list-style-type: none"> - Miastenia gravis* - <u>Síndrome miástenico de Eaton-Lambert*</u> (SMEL) - Neuromiotonía adquirida* - <u>Dermatomiositis</u> - Miopatía aguda necrotizante

Las patologías subrayadas se refieren a los síndromes considerados como clásicos.

Las patologías * están frecuentemente asociadas a la presencia de anticuerpos.

SGB = Síndrome de Guillain-Barré.

Existen características clínicas que sugieren la presencia de un síndrome paraneoplásico. Los síntomas se suelen desarrollar rápidamente en días o pocas

semanas y luego se estabilizan, dejando a los pacientes discapacitados. En algún caso, los síntomas son más insidiosos y pueden confundirse con trastornos crónicos degenerativos. La mejoría espontánea de estos síndromes no es frecuente y suele indicar un origen no paraneoplásico. La mayoría de los SPN ocurre en pacientes que no tenían previamente un cáncer, que suele ser indetectable al inicio de los síntomas neurológicos. A nivel diagnóstico, en todos los pacientes se debería realizar un estudio del LCR, para descartar aquellos síndromes que pueden parecerse a los paraneoplásicos (meningitis neoplásica o infecciosa) y estudiar la presencia o no de anticuerpos onconeuronales. Los hallazgos más consistentes en el LCR son: leve pleocitosis, elevación de las proteínas, síntesis intratecal de inmunoglobulinas y en algún caso la presencia de bandas oligoclonales. En algunos pacientes, el estudio del LCR es absolutamente normal.

Las pruebas de neuroimagen tienen importancia, especialmente la resonancia magnética (RM) craneal o la tomografía por emisión de positrones (PET)¹⁰², aunque en algunos casos no aporten la información deseada. En un estudio en el que se evaluó a pacientes con un SPN donde no se había logrado identificar un tumor por métodos convencionales, se vió que si se les practicaba una FDG-PET (fluoro-2-deoxi-glucosa-PET), ésta facilitaba la detección del mismo en un 70% de los casos¹⁰³. Esto es mayor que el porcentaje encontrado en un estudio retrospectivo previo (30%)¹⁰⁴. Quizá parte de la diferencia se deba a que los pacientes en el estudio prospectivo, fueron evaluados por un equipo multidisciplinar de médicos: radiólogos, neumólogos, cirujanos, neurólogos y patólogos. La PET resultó ser útil para detectar el tumor en todos aquellos pacientes con un SPN con diferentes tipos de anticuerpos, no sólo en aquellos con anticuerpos anti-Hu. Además en el estudio prospectivo con PET, no se pudo detectar el tumor utilizando PET y técnicas radiológicas convencionales en un 5,5% de los casos, que se compara con el 16,5% de otro estudio similar que no utilizó PET¹⁰⁵. A raíz de los estudios publicados, la FDG-PET es especialmente

útil en caracterizar pequeños tumores torácicos y especialmente nódulos linfáticos mediastínicos. Con el timoma, por ejemplo, no siempre ocurre igual, y hay autores que han demostrado que la captación por parte de un timoma, no es un índice de malignidad¹⁰⁶. Parece que la PET es menos eficaz en la detección de tumores extra-torácicos, especialmente cuando el tamaño de los nódulos es demasiado pequeño en relación a la cámara de escaneo de la PET. El uso de la PET en el cáncer de mama es muy controvertido, hay estudios publicados que demuestran que es útil y otros que demuestran lo contrario¹⁰⁷. Así pues, parece que se puede recomendar el uso de una FDG-PET en aquellos pacientes con sospecha de tumor torácico con exploraciones radiológicas negativas; debiéndose evaluar cualquier resultado positivo cautelosamente, por tratarse, quizá, de un tumor benigno. En el caso de los pacientes con anticuerpos onconeuronales positivos, debe intentar buscarse el tumor realizando una FDG-PET si el resto de exploraciones han resultado ser negativas, incluso si la FDG-PET es negativa, deben realizarse sucesivos exámenes de control. Probablemente, en los SPN, la ausencia de captación en estadios iniciales del tumor se deba a que el SPN permite un diagnóstico precoz, en momentos en los que la respuesta inmune todavía no es del todo eficaz¹⁰⁸. Por lo tanto, se debe recomendar la práctica de ambas técnicas de imagen, debiéndose interpretar con cuidado en aquellos pacientes con un síndrome neurológico paraneoplásico no típico¹⁰⁹.

La detección de anticuerpos antineuronales debe realizarse en suero y LCR de todos aquellos pacientes en los que se sospeche un síndrome paraneoplásico. Estos anticuerpos se asocian con algunos tumores específicos. Los anticuerpos bien caracterizados son aquellos cuya identidad molecular es conocida y que han sido identificados por varios investigadores. Hay anticuerpos que se asocian con trastornos específicos pero no diferencian entre los casos paraneoplásicos y no paraneoplásicos. Incluso, el análisis de anticuerpos es útil en la identificación de síndromes que se solapan. Es importante recordar también, que diferentes

respuestas inmunes pueden asociarse a un trastorno neurológico similar sugiriendo una heterogeneidad clínica e inmunológica. Se ha considerado, por un panel de expertos, que los anticuerpos onconeuronales, en ausencia de un tumor detectado, si están bien caracterizados, deberían ser utilizados para definir un SPN definitivo. Se considerará que un anticuerpo está bien caracterizado cuando:

- a) los anticuerpos estén bien reconocidos con técnicas de inmunohistoquímica de rutina y para los que debe utilizarse el inmunoblot sobre proteínas recombinantes para confirmar sus especificidades,
- b) haya un número de casos descritos del anticuerpo asociado con tumores,
- c) haya una descripción de síndromes neurológicos bien caracterizados asociados a anticuerpos,
- d) haya una identificación no ambigua de los anticuerpos entre los diferentes estudios, y
- e) la frecuencia de la presencia de estos anticuerpos en pacientes sin cáncer sea mínima o nula.

Seguramente, los anticuerpos que actualmente son considerados como parcialmente caracterizados, a medida que se vaya ampliando nuestro conocimiento sobre los mismos, irán considerándose como bien caracterizados.

Globalmente los SPN, son un grupo de síndromes mediados por respuestas inmunológicas desencadenadas por tumores que expresan proteínas del sistema nervioso. Estas respuestas inmunológicas provocan una degeneración de áreas localizadas o multifocales del sistema nervioso, causando diversos síntomas y déficits. Las respuestas se caracterizan por la presencia de anticuerpos antineuronales en el suero y en el LCR y/o la presencia de infiltrados de células T en el tumor o en el SNC. Estos anticuerpos se pueden utilizar como marcadores diagnósticos del síndrome paraneoplásico o del cáncer subyacente.

No todos los SPN tienen que ir acompañados necesariamente de anticuerpos (al menos por las técnicas de diagnóstico actuales), por lo tanto el papel de los autoanticuerpos todavía no está muy establecido¹¹⁰, aunque se deberían tener en cuenta como marcadores de enfermedad neoplásica. Además, hay evidencia que en algunos de estos síndromes, los mecanismos mediados por células T pueden ser la causa del trastorno neurológico y contribuir al rechazo del tumor.

Tabla 11. Anticuerpos onconeuronales

(modificado según Graus *et al.*, 2004)

Anticuerpo	Síndrome	Tumor asociado
Anticuerpos onconeuronales bien caracterizados		
Anti-Hu (ANNA-1)	Encefalomiелitis Encefalitis cortical, límbica y de tronco Degeneración cerebelosa paraneoplásica, miелitis, neuropatía sensitiva, disfunción autonómica	CPCP
Anti-Yo (PCA-1)	Degeneración cerebelosa paraneoplásica	Ginecológicos y de mama
Anti-Ri (ANNA-2)	Degeneración cerebelosa con o sin opsoclonus, encefalitis tronco	Mama, ginecológicos, CPCP, vejiga, linfoma Hodgkin
Anti-anfifisina	Síndrome de la persona rígida Encefalomiелitis	Mama, CPCP
Anti-recoverina	Degeneración retiniana (retinopatía)	CPCP, melanoma
Anti-CV2/CRMP5	Encefalomiелitis, corea, degeneración cerebelosa, neuropatía sensitiva	CPCP, timoma
Anti-Ma 2 (Ta)	Encefalitis límbica y de tronco	Cáncer testicular
Anti-Ma 1	Encefalitis de tronco, degeneración cerebelosa	Cáncer de pulmón, y otros cánceres
Anticuerpos onconeuronales parcialmente caracterizados		
Anti-Zic 4	Degeneración cerebelosa paraneoplásica	CPCP
Anti-Tr (PCA-Tr)	Degeneración cerebelosa paraneoplásica	Linfoma de Hodgkin
Anti-mGluR1	Degeneración cerebelosa paraneoplásica	Linfoma Hodgkin
ANNA-3	Varios SPN del SNC	CPCP
Anti-PCA-2	Varios SPN del SNC	CPCP
Anti-células bipolares retina	Retinopatía asociada a melanoma	Melanoma

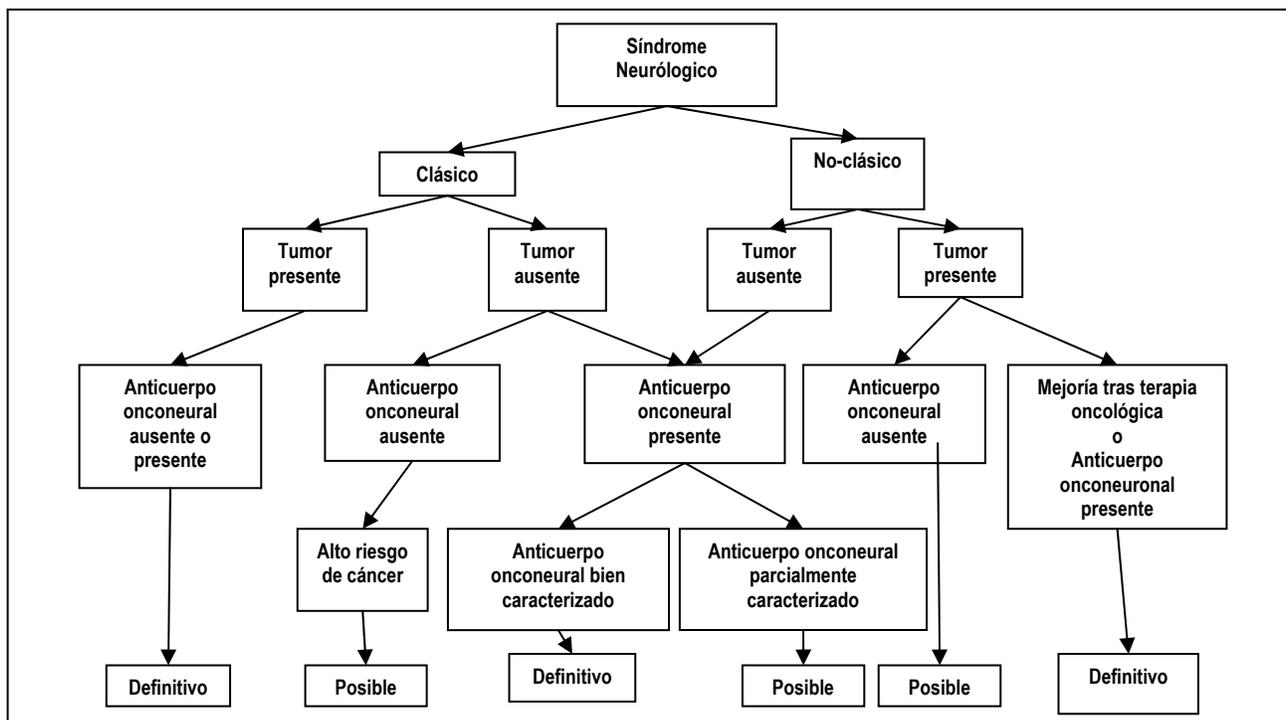
Todos los pacientes con síndromes paraneoplásicos se deben examinar exhaustivamente para descartar una neoplasia. Actualmente, y tras la reunión de

una serie de investigadores, se han propuesto unos criterios diagnósticos para los síndromes paraneoplásicos¹⁰¹. Estos criterios tienen en consideración: (1) el tipo de síndrome neurológico, (2) el tipo de anticuerpo antineuronal, y (3) la presencia o ausencia de un cáncer. Se han propuesto dos niveles de evidencia: un síndrome paraneoplásico definitivo o posible.

Tabla 12. Criterios diagnósticos de un síndrome paraneoplásico (SPN) del SNC
(según Graus *et al.*, 2004)

SPN definitivo	SPN posible
1. Síndrome clásico con un cáncer diagnosticado durante los 5 últimos años desde el desarrollo de los síntomas neurológicos.	1. Síndrome clásico con alto riesgo de cáncer, sin anticuerpos antineuronales.
2. Síndrome no clásico que se resuelve o mejora significativamente tras el tratamiento del cáncer.	2. Síndrome neurológico (clásico o no) sin cáncer y con anticuerpos antineuronales parcialmente caracterizados.
3. Síndrome no clásico con un cáncer diagnosticado durante los 5 últimos desde el desarrollo de los síntomas neurológicos y la presencia de anticuerpos antineuronales positivos.	3. Síndrome no clásico con un cáncer diagnosticado durante los últimos 2 años desde el desarrollo de los síntomas neurológicos, sin anticuerpos antineuronales.
4. Síndrome neurológico (clásico o no) sin cáncer y con anticuerpos antineuronales bien caracterizados.	

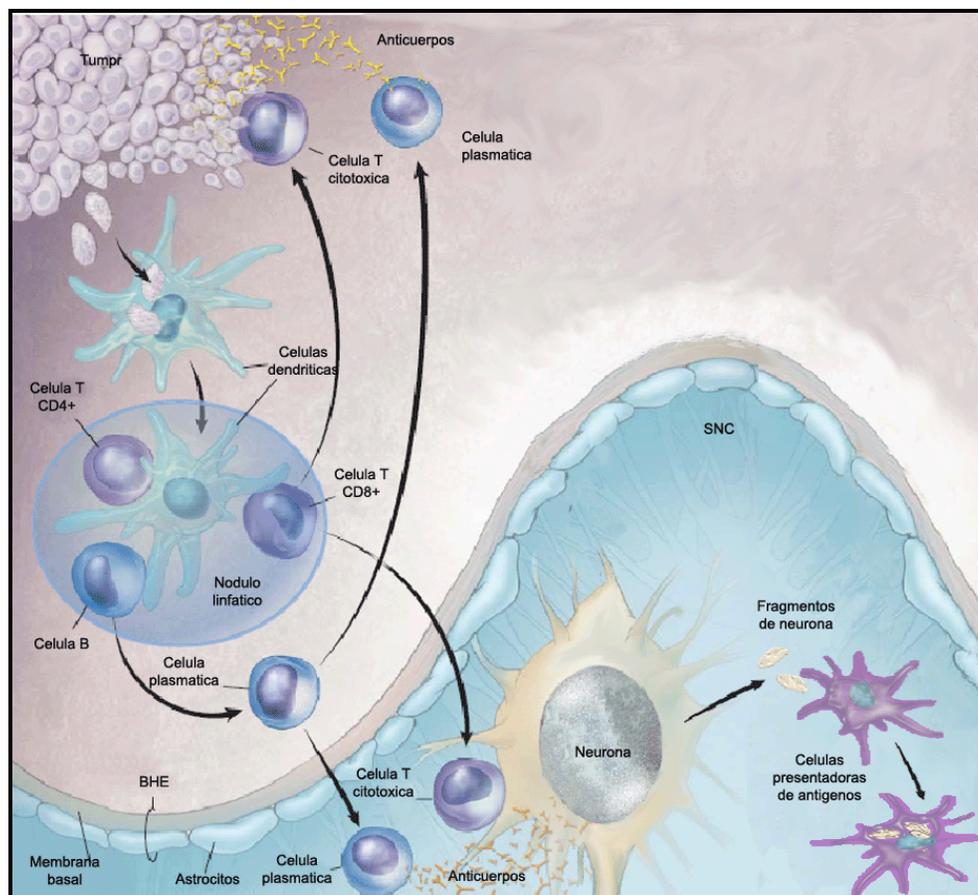
Figura 6. Diagrama de flujos mostrando el nivel de evidencia diagnóstica del síndrome neurológico según los criterios definidos por el panel de expertos (según Graus et al., 2004)



Fisiopatología

Se cree que la relación entre los síndromes paraneoplásicos neurológicos (SPN) y el cáncer es inmunológica. El mecanismo se basa en la expresión ectópica por el tumor de un antígeno que normalmente se expresa exclusivamente en el sistema nervioso, a estos antígenos se les denomina antígenos onconeuronales. El antígeno tumoral es idéntico al antígeno neuronal, pero por causas desconocidas el sistema inmune no lo identifica como propio, dando lugar a un ataque inmune. Estos antígenos están presentes en el tumor de todos los pacientes con un SPN y en muchos de los pacientes sin este tipo de trastorno. Además, los antígenos de estos genes no están mutados en las células tumorales; por lo tanto no podemos atribuir los SPN a la infrecuencia de la expresión de los antígenos tumorales relevantes o a mutaciones en los genes que codifican estos antígenos, no hay tolerancia¹¹¹.

Figura 7. Modelo inmunopatológico en los síndromes paraneoplásicos neurológicos
(modificado según Darnell y Posner, 2003 ¹¹² y según Roberts y Darnell, 2004 ¹¹³)



El mecanismo patogénico se basa en que un tumor sistémico expresa una proteína neuronal que el sistema inmune no reconoce como propia. La respuesta puede mediarse vía una activación de las células T (respuesta al tumor) o vía una tolerancia a las células T (fracaso de respuesta al tumor). Esto depende de la extensión de: la apoptosis celular tumoral, la presencia de células dendríticas en el tejido, la actividad de los CD4+ en el nódulo linfático y la variación individual de los CD4+ y CD8+ en cada paciente. 1) Un tumor que no afecta al sistema nervioso expresa una proteína neuronal que no reconoce como propia. Las células tumorales apoptóticas son fagocitadas por las células dendríticas, que migran a los nódulos linfáticos y presentadas a las células T. 2) Esto activa las células CD8+, CD4+ y B, provocando una respuesta inmune humoral y celular. 3) Las células B maduran en células plasmáticas que producen anticuerpos contra el antígeno tumoral. Éstas pueden diferenciarse de las células B circulantes o pueden cruzar la BHE, resultando en niveles elevados de anticuerpos en el LCR. 4) Las células T citotóxicas CD8+ activadas pueden disminuir la velocidad del crecimiento tumoral y cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) atacando a las neuronas que presentan los antígenos. Como resultado de este ataque, las neuronas pueden entrar en una apoptosis y que sean fagocitadas por las células presentadoras de antígenos, amplificando todavía más la respuesta autoinmune; contribuyendo los anticuerpos a la muerte neuronal.

Los antígenos onconeuronales están presentes en los tumores de todos los pacientes con SPN y presencia de anticuerpos. El antígeno onconeuronal en la célula tumoral es probablemente reconocido por el sistema inmunológico cuando las células tumorales sufren una apoptosis y los cuerpos apoptóticos que contienen el antígeno son fagocitados por células dendríticas¹¹⁴. Existen evidencias que los antígenos del tumor son idénticos en estructura al antígeno neuronal pero, sin embargo, no son reconocidos como propios por el sistema inmune, dando lugar a una respuesta inmunológica¹¹⁵ que puede controlar el crecimiento tumoral e incluso, en alguna ocasión, eliminarlo¹¹⁶. Por este motivo, en los síndromes paraneoplásicos, habitualmente el tumor está oculto y los síntomas neurológicos preceden el diagnóstico tumoral, en aproximadamente dos tercios de los casos. Se ha descrito que los pacientes con un SPN tienen un mejor pronóstico que los pacientes con tumores histológicamente idénticos que no están asociados con un SPN¹¹⁷. Aunque, no todos los pacientes que presentan un SPN tienen respuestas contra el tumor eficaces, incluso en más de un 90% de los individuos con SPNs se pueden identificar tumores. Aproximadamente, un 50% de los pacientes con un SPN fallece de dicho cáncer y el otro 50% de la enfermedad neurológica desencadenada por el mismo. En la degeneración cerebelosa paraneoplásica, en un 5% a un 10% de los pacientes, el tumor no se encuentra nunca y quizá eso demuestra una supresión tumoral eficaz, en la que puede ser importante la respuesta inmune que genera el SPN¹¹⁸. En pacientes con un SPN, aunque tengan tumores idénticos histológicamente a los pacientes sin síndromes paraneoplásicos, es más probable que el tumor esté infiltrado por células inflamatorias, incluyendo células T, células B y células plasmáticas. Se estudió retrospectivamente, si los pacientes sin un SPN producían anticuerpos anti-Hu, encontrando que un 15% de pacientes con un cáncer de pulmón de célula pequeña sin un SPN tenían niveles bajos de anticuerpos anti-Hu¹¹⁹ y además, la producción de anticuerpos estaba relacionada con una enfermedad limitada en estadio, mejores respuestas

a la quimioterapia y mayor supervivencia¹²⁰. Esto nos indica que, (1) los pacientes con tumores que expresan potencialmente antígenos inmunológicos (como el Hu) fracasan en generar una respuesta antitumoral inmunológica; (2) un grupo de pacientes presenta respuestas antitumorales parcialmente eficaces sin desarrollar un SPN. La diferente respuesta que se produce en los pacientes con un tumor y aquellos con un SPN, ayuda a estudiar las respuestas antitumorales inmunológicas.

El mecanismo exacto por el que la reacción inmune lesiona las estructuras neurales no está establecido para la mayoría de SPNs. Los dos únicos síndromes que cumplen los criterios de Drachman para ser una enfermedad autoinmune mediada por anticuerpos (SMEL y miastenia gravis) no afectan al SNC y están mediados exclusivamente por células B sin un componente celular T. El síndrome de la persona rígida, puede estar causado por anticuerpos anti-anfifisina, que es una proteína sináptica con función en la endocitosis de vesículas en las terminaciones nerviosas¹²¹. Esto se observó al inyectar linfocitos T de suero con IgG de un paciente afecto a animales preparados, para inducir una permeabilidad de la BHE. Se demostró unión de la IgG en el SNC, presentando el suero anticuerpos anti-anfifisina, aunque no se pudo establecer causalidad. Otra serie de experimentos donde se estudió este mecanismo fue en la degeneración cerebelosa paraneoplásica con anticuerpos anti-Yo, donde se han encontrado células T CD8 antígeno-específicas cdr2 (proteína relacionada con antígeno de la degeneración cerebelosa tipo 2), tanto en el tumor como en el cerebro¹²². Estudios posteriores en pacientes con una DCP, han utilizado células presentadoras de antígeno autólogas (células dendríticas) para reactivar las respuestas al antígeno cdr2 en células T citotóxicas. Las respuestas reactivadas en las células T han resultado positivas en todos los pacientes estudiados. Esto llevó a realizar librerías genéticas de ADNs complementarios que codifican antígenos tumorales, diana del sistema inmunitario en los SPN. Dado que la transferencia pasiva de anticuerpos de pacientes con miastenia gravis y timoma,

SMEL y CPCP, da lugar a un síndrome neurológico, se postuló que los SPNs compartían un mecanismo patológico común. Pero, no sólo no se pudo reproducir la transferencia pasiva de anticuerpos humanos a animales, sino que además se observó que la reducción de los niveles de anticuerpos en el LCR no mejoraba la clínica y, que además en los pacientes con un SPN había evidencia de una inmunidad tumoral eficaz. Esto ha complementado aquellos estudios que describen un repertorio limitado de células T con una cadena V β en pacientes con un síndrome Hu, sugiriendo que son mono u oligoclonales y que responden a un antígeno específico¹²³. La cadena V β es una de las dos cadenas de una célula T receptora -V α y V β -. En el SNC de pacientes con un SPN, se encuentran tanto células B como células T. Las células B se localizan en los espacios perivasculares y las células T en los espacios perivasculares y el parénquima¹²⁴. Los anticuerpos en los SPN reaccionan con una porción del sistema nervioso que es responsable de los síntomas clínicos.

Los anticuerpos paraneoplásicos (IgG anti-Hu) han sido identificados en el sistema nervioso y dentro de neuronas de algunos pacientes que fallecieron de encefalomielitis paraneoplásica¹²⁵. Existen más evidencias de la presencia de una reacción del sistema inmunológico a través del estudio de LCR en pacientes con trastornos paraneoplásicos del SNC. En el transcurso de la enfermedad, normalmente hay una pleocitosis con proteínas ligeramente elevada, IgGs y bandas oligoclonales. Las bandas oligoclonales en el LCR se han identificado como anticuerpos paraneoplásicos¹²⁶. La relativa especificidad del anticuerpo (expresado como una concentración del anticuerpo contra la IgG total) en el LCR indica una síntesis intratecal. Incluso cinco plasmaféresis, aunque eficaces en disminuir los títulos de anticuerpos séricos, no tienen efecto en los títulos de anticuerpos del LCR¹²⁷.

La evasión por el tumor de la vigilancia inmunológica, es decir, la ausencia de activación de las células T tras la exposición a un antígeno, también conocido

como fenómeno de tolerancia de las células T, es el mecanismo a estudiar. Los linfocitos T se pueden separar en dos subpoblaciones según si expresan CD4 o CD8. Los CD4+ son responsables de ayudar a otras células inmunes, mientras que los CD8+ pueden eliminar a las células infectadas por un virus. La presentación cruzada se define como el procesamiento de antígenos exógenos utilizando la vía del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I. La tolerancia cruzada se refiere a la inducción de la inmunidad o tolerancia de los linfocitos citotóxicos tipo T por antígenos presentados de forma cruzada. Las células dendríticas son responsables de capturar antígenos y también de capturar fragmentos de células apoptóticas. Tras la captura de estos fragmentos, las células dendríticas maduran y regulan positivamente el CCR7, que es un receptor de quimiocinas que es esencial para acceder a las zonas ricas en células T del nódulo linfático¹²⁸. Actualmente se cree que la presentación cruzada participa en la inducción a la tolerancia de las células T. Dicha tolerancia es mediada por las células dendríticas y lleva a la supresión de células T autorreactivas. Los niveles de expresión de los antígenos, el momento en el que se expresan y la capacidad de ayuda, determinan crucialmente si los auto-antígenos provocan el fenómeno de la tolerancia-cruzada¹²⁹. Así pues, la presentación cruzada puede dar lugar tanto a la activación de las células T como a la tolerancia de las células T. La presencia o ausencia de las células CD4+ antígeno reactivas es crucial para determinar la activación o tolerancia de las células T CD8+. En el sistema nervioso central, los antígenos diana son intracelulares. En estos casos, el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II podrían ser las moléculas que presentaran el antígeno a las neuronas. Esto apoya la hipótesis de que las células T reconociesen el antígeno intracelular que se les presenta como un complejo peptídico tipo MHC y por lo tanto eliminasen a las neuronas¹³⁰.

b. Ataxia cerebelosa y enteropatía al gluten

La sensibilidad al gluten, con o sin enfermedad celíaca, ha sido sugerida como una causa tratable de enfermedad neurológica, concretamente de la ataxia cerebelosa esporádica idiopática. La sensibilidad al gluten es un estado de respuesta inmunológica aumentada frente al gluten ingerido en individuos genéticamente susceptibles. Los síntomas gastrointestinales se han considerado como la forma de presentación principal. La enteropatía por sensibilidad al gluten es la enfermedad celíaca. Es un trastorno crónico inflamatorio del intestino delgado caracterizado por síntomas clínicos de malabsorción. La lesión histológica característica es la atrofia vellosa del intestino delgado asociada a hiperplasia de las criptas, aunque actualmente existe un espectro de anomalías histológicas. Los pacientes mejoran con la eliminación del gluten de la dieta. Clínicamente, se manifiesta con síntomas gastrointestinales, los clásicos serían la diarrea y pérdida de peso con o sin presencia de un síndrome de malabsorción. Los síndromes de malabsorción clásicos incluyen la anemia por déficit de hierro, el déficit de folato, el déficit de vitaminas E, K, A, D. Se puede asociar a la presencia de transaminasas elevadas, hipoparatiroidismo u osteoporosis. Se han asociado a la enfermedad celíaca una serie de enfermedades autoinmunes, algunas se cree que están en relación con el gluten como la diabetes tipo I, la tiroiditis autoinmune, la hepatitis autoinmune, la cirrosis primaria biliar o el síndrome de Sjögren; y otras serían gluten independientes como el síndrome de Down y Turner y el déficit de IgA. La dermatitis herpetiformis es una enfermedad dermatológica asociada a la sensibilidad al gluten que cursa con un rash vesiculobuloso. Un 80% de estos pacientes presentan una biopsia intestinal indistinguible de los pacientes con enfermedad celíaca. La enfermedad no es por una respuesta directa dérmica al gluten sino que se trata del resultado de una sensibilidad al gluten intestinal. Sería debido a la producción de ciertos anticuerpos en el intestino (en respuesta

a la gliadina) que reaccionan de forma cruzada con la transglutaminasa tisular de la piel¹³¹.

La mayoría de enfermedades autoinmunes son multifactoriales con factores medioambientales y genéticos implicados. El gluten es un factor medioambiental y el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) es un factor genético bien caracterizado. La mayoría de pacientes con una enfermedad celíaca tienen un DQ2 (90%) y una minoría el DQ8. Los estudios de asociación no han ayudado a identificar regiones susceptibles, con excepción de la región HLA en el cromosoma 6p21. Además de la región HLA, las otras dos regiones que se han identificado en menor proporción son la 5q32 y la 19p13¹³². Los pacientes con enfermedad celíaca tienen autoanticuerpos contra la TG2 (transglutaminasa tipo 2) y en alguna ocasión contra la calreticulina y la actina. Estos anticuerpos contra la TG2 son isotipos IgA e IgG, pero los IgA que están producidos en la mucosa intestinal y que muestran signos de mutación somática, demuestran una alta especificidad para la enfermedad. La TG2 esta implicada en la formación de TGF- β activo, su inhibición puede tener efectos sobre la desregulación de los enterocitos y las células inmunes. Además de su actividad enzimática, la TG2 tiene una función en la motilidad de los fibroblastos y monocitos por interacciones con las integrinas y fibronectina. La formación de los autoanticuerpos contra la TG2 todavía no se comprende completamente. La ingesta de gluten daría lugar a la presentación de la gliadina, proteína soluble en alcohol, por células presentadoras de antígenos, en asociación con el antígeno del leucocito humano HLA-DQ2 o HLA-DQ8, a las células T que expresan el receptor α/β . Estas células T se activarían y reclutarían a otros linfocitos que producen interferón γ , factor de necrosis tumoral α e interleucinas 4, 5, 10 y 13. Estas citoquinas lesionarían el epitelio del intestino delgado. El epitelio lesionado daría lugar a una liberación de transglutaminasa tisular, que es una enzima citosólica. Esta enzima alteraría la gliadina por deamidación, esto aumentaría la presentación de gliadina por los complejos HLA-DQ2 y HLA-DQ8 a linfocitos

reactivos a gliadina en el intestino celíaco. Esto se completaría con una mayor expresión de HLA-DQ2 en el epitelio del intestino delgado por las citoquinas que liberan los linfocitos, permitiendo que se presentase más gliadina a los linfocitos sensibilizados. Se cree que las células T autorreactivas para la TG2 darían la ayuda necesaria para la producción de las IgA anti-TG2 por las células B. Otra explicación, sería que los complejos de gluten y TG2, permiten a las células T gluten-reativas diferenciar las células B TG2-específicas. Esto ayudaría a comprender como la ausencia de gluten permite que no se diferencien las células B en células plasmáticas, por falta de las células T.

Los criterios diagnósticos para la enfermedad celíaca se basan en la histología de la biopsia del intestino delgado que muestra una atrofia vellosa y una respuesta clínica inequívoca¹³³. Las pruebas serológicas, la inmunohistoquímica y el tipo de HLA (HLA-DQ2) también tienen un papel en el algoritmo diagnóstico. Los anticuerpos IgA antigliadina clásicos han sido sustituidos por los IgA antiendomiso y los antitransglutaminasa tisular. Si la sospecha clínica es baja, se estudia la presencia de anticuerpos IgA titulares transglutaminasa o los antiendomiso y los niveles de IgA sérica total (descartar un déficit de IgA). Si son positivos entonces se realiza la biopsia intestinal. En caso de que la sospecha clínica sea elevada, entonces se estudian la IgA transglutaminasa tisular o antiendomiso y directamente se hace la biopsia intestinal. En caso de que la serología sea negativa y la biopsia sea positiva se genotipa el HLA, además de considerar otras causas de enteritis. Si la serología es positiva y la histología es negativa se repite la biopsia. Se confirma el diagnóstico cuando ambas pruebas son positivas.

Es posible que los autoanticuerpos contra la TG2 den lugar a manifestaciones extraintestinales. Hay evidencias que indican que la ataxia cerebelosa idiopática puede estar relacionada con la sensibilidad al gluten. Ésta se define como una

ataxia cerebelosa esporádica asociada con la presencia de anticuerpos antigliadina circulantes en ausencia de otra etiología alternativa para la ataxia.

La fisiopatología de la ataxia cerebelosa relacionada con la sensibilidad al gluten es probablemente inmunomediada, las evidencias son: (1) la reactividad cruzada entre los anticuerpos antigliadina y las células cerebelosas de Purkinje; (2) la presencia de bandas oligoclonales en hasta un 50% de los pacientes con ataxia; (3) la histopatología inflamatoria en el tejido cerebeloso; (4) la mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes en los pacientes con ataxia por gluten¹³⁴. Además, se ha descrito alguna serie corta en la que los pacientes mejoran con tratamiento con inmunoglobulinas endovenosas. Se han descrito casos de pacientes con manifestaciones neurológicas en los que se diagnosticó una sensibilidad al gluten mediante la presencia de anticuerpos anti-gliadina y anti-endomisio y una biopsia intestinal¹³⁵. En la mayoría de ocasiones las manifestaciones neurológicas preceden a la enfermedad intestinal. Normalmente, el tratamiento con una dieta específica no consigue revertir los síntomas neurológicos. Sólo un 30% de los pacientes con una ataxia por gluten, tiene evidencia de la presencia de una enteropatía¹³⁶. Los pacientes con una ataxia por gluten son indistinguibles de los pacientes sin enteropatía. En este sentido, se parecen a los pacientes con dermatitis herpetiformis. En un estudio, al comparar los niveles de anticuerpos antigliadina IgG que se unían al SNC entre los pacientes recién diagnosticados de enfermedad celíaca con aquellos con una degeneración cerebelosa y con controles sanos, se observó que la unión de los anticuerpos se producía en los dos primeros grupos, aunque era mayor en los que tenían síntomas cerebelosos¹³⁷. Por lo tanto, los anticuerpos antigliadina son un buen marcador diagnóstico para la ataxia asociada a la sensibilidad al gluten. Las críticas a esta hipótesis llegan porque los anticuerpos antigliadina son muy sensibles pero poco específicos para la presencia de una sensibilidad al gluten. Sin embargo, se defiende la función de los anticuerpos antigliadina con otras dos evidencias: (1) los estudios de HLA; los pacientes con

ataxia y sensibilidad al gluten (definidos por la presencia de anticuerpos antigliadina), tienen una asociación con el HLA similar a la que se encuentra en los pacientes con enfermedad celíaca: el 72% de pacientes tiene HLA DQ2 (35% población general), el 6% tiene HLA DQ8 y el resto tiene HLA DQ1. Se descartó que esta asociación fuese secundaria a la prevalencia del HLA DQ2 en los pacientes con ataxia idiopática familiar y esporádica. (2) La presencia de anticuerpos contra células de Purkinje en pacientes con ataxia y sensibilidad al gluten. Parece que los anticuerpos antigliadina reaccionan de forma cruzada con los epítomos de las células de Purkinje en el cerebelo humano y en rata, aunque estos anticuerpos aún no se han caracterizado. Estudios de RM con espectroscopía muestran también como los pacientes con sensibilidad al gluten y ataxia tienen un metabolismo cerebeloso diferente, respecto a los controles¹³⁸.

La transglutaminasa tisular tipo 2 (TG2) se ha identificado como un autoantígeno reconocido por los anticuerpos antiendomiso, que son el marcador más específico para la presencia de una enfermedad celíaca. Actualmente, los anticuerpos contra la TG2 también son aceptados como un marcador de una enfermedad celíaca. Se ha demostrado que los pacientes con dermatitis herpetiformis y enfermedad celíaca tienen presencia de estos anticuerpos en la mucosa del intestino delgado¹³⁹, y que estos anticuerpos se depositaban en la mucosa antes de la presencia de lesiones intestinales o de la detección de los anticuerpos en suero. Estos autoanticuerpos también se han encontrado en el tejido extraintestinal (p.ej. hígado, músculo, nódulos linfáticos) de los pacientes con enfermedad celíaca, reforzando que la sensibilidad al gluten es una enfermedad sistémica con afectación de diversos órganos. Finalmente, para demostrar que la ataxia por gluten pertenece al mismo espectro de enfermedades relacionadas con la sensibilidad al gluten como la enfermedad celíaca y la dermatitis herpetiformis, se han encontrado depósitos de IgA específica para TG2 en el intestino (yeyuno) de los pacientes con ataxia por gluten (sin encontrarse dicha inmunoglobulina en los controles sanos), alrededor

de los vasos en el cerebro y en el parénquima cerebral (sobretudo en el cerebelo y tronco del encéfalo) de un paciente. Por lo tanto, los anticuerpos anti-tisulares transglutaminasa IgA podrían estar presentes en el intestino y cerebro de los pacientes con ataxia por gluten con o sin una enteropatía presente, de la misma manera que pudiese ocurrir en los pacientes con enfermedad celíaca, enfermedad celíaca latente y en aquellos pacientes con dermatitis herpetiformis, no estando presentes en los pacientes con ataxia idiopática. Esto apoya la hipótesis de que la ataxia por gluten es un trastorno inmunomediado, perteneciendo al grupo de enfermedades por sensibilidad al gluten¹⁴⁰. En estas manifestaciones sintomatológicas, el intestino parece que sea una diana inicial, dado que el anticuerpo anti-TG2 está presente incluso antes de que se desarrolle la enteropatía. El hallazgo de la presencia de autoanticuerpos anti-TG2 en la capa muscular de las arterias y arteriolas cerebrales, cerebelosas y del tronco del encéfalo, sugiere que la TG2 pueda estar implicada en la fisiopatología de la ataxia por gluten. Los hallazgos patológicos de la presencia de linfocitos perivascuales sugieren también la presencia de una inflamación vascular. Quizá los autoanticuerpos anti-TG2 provoquen la disrupción de la BHE, permitiendo que el SNC esté expuesto a los anticuerpos relacionados típicamente con el gluten (como los antigliadina y anti-endomiso). Esto produce una reactividad cruzada entre los autoanticuerpos-TG2 y las células de Purkinje que contribuye a la ataxia cerebelosa por gluten.

A pesar de todo, se necesita todavía averiguar por qué hay ciertos pacientes con ataxia esporádica idiopática que no tienen anticuerpos antigliadina, antiendomiso ni transglutaminasa séricos; presentando sin embargo, linfocitos intraepiteliales intestinales con el receptor γ/δ y una clínica de sensibilidad al gluten. Aunque la transglutaminasa es un autoantígeno en la enfermedad celíaca, se trata de una proteína multifuncional que juega un papel importante en el sistema nervioso. La TG2 a nivel intestinal deamida los sustratos ricos en donantes de glutamina como las proteínas de la gliadina, resultando en

complejos gliadina-TG2. Dichos complejos pueden ser importantes para que la diseminación de epítomos desde la gliadina a la TG2, resultando en la formación de anticuerpos tisulares transglutaminasa¹⁴¹. Curiosamente, la TG2 se ha descrito en la formación de cuerpos de inclusión en las enfermedades de expansión trinuclear como la ataxia autosómica dominante tipo 6 y la enfermedad de Huntington, aunque esto no se ha confirmado en grandes series. De forma curiosa, se han descrito, también, dos casos de afectación en forma de neuromielitis óptica (NMO), asociada a anticuerpos antigliadina, indicando una posible etiología autoinmune de la NMO¹⁴².

c. Encefalitis de Rasmussen y anticuerpos contra los receptores ionotrópicos del glutamato tipo 3 (RGlu3)

La encefalitis de Rasmussen es un enfermedad progresiva inflamatoria cerebral infantil, que en principio solo afecta a un hemisferio cerebral, y que resulta en la presencia de crisis epilépticas difíciles de tratar, hemiparesia y deterioro cognitivo¹⁴³. Las crisis habitualmente son resistentes a la farmacoterapia habitual. En algún caso se ha observado que el tratamiento con corticoides o inmunoglobulinas ev. es beneficioso¹⁴⁴. Aunque en la mayoría de los casos, el control de la epilepsia sólo se consigue mediante una hemisferectomía.

Se hipotetizó por primera vez un origen autoinmune en 1994, tras la observación casual de Rogers y colaboradores que en el conejo (modelo animal) existía una correlación entre la presencia de una encefalitis de Rasmussen y la presencia de anticuerpos séricos contra el receptor del glutamato tipo 3 (RGlu3)¹⁴⁵. En estos experimentos, los conejos inmunizados con una proteína del receptor del glutamato tipo 3 desarrollaban crisis comiciales y tenían unos cambios histopatológicos similares a los que se encontraban en la encefalitis de Rasmussen. Estos anticuerpos eran detectados por análisis proteicos con inmunoblot y por inmunoreactividad en las células que habían sido transfectadas

y que expresaban RGlú3. A pesar de todo, en otros experimentos con ratones inmunizados con RGlú3, que desarrollaban anticuerpos anti-RGlú3 y una patología cerebral que se acostumbraba a observar en la enfermedad, no desarrollaban epilepsia¹⁴⁶.

La presencia de los anticuerpos contra los receptores ionotrópicos del glutamato tipo 3 en la encefalitis de Rasmussen varía según las series y casos publicados y la respuesta a la inmunoterapia también es muy variable. En la serie publicada por Watson y colaboradores, no pareció encontrarse ninguna asociación entre ambos¹⁴⁷. Además, se han encontrado estos anticuerpos en otras formas de epilepsia focal refractaria al tratamiento (“epilepsia catastrófica”)¹⁴⁸. En esta serie italiana, se encontraron anticuerpos anti-RGlú3 en pacientes con encefalitis de Rasmussen y también en pacientes con epilepsia refractaria al tratamiento. Es decir, que la presencia de anticuerpos anti-RGlú3 era altamente específica para la presencia de epilepsia, pero la sensibilidad para los pacientes con encefalitis de Rasmussen era baja. Así pues, parece que los anticuerpos anti-RGlú3 son un marcador de la presencia de crisis frecuentes, y que quizá dicha frecuencia induzca a una liberación local de estímulos pro-inflamatorios que a la larga podrían dar lugar a una sensibilización por el autoantígeno RGlú3. La degeneración del SNC puede ser consecuencia de la agresión de las células citotóxicas tipo T que están presentes en el cerebro de pacientes con encefalitis de Rasmussen¹⁴⁹. Así pues, los anticuerpos anti-RGlú3 son muy específicos para la presencia de epilepsia refractaria al tratamiento. Otro estudio, observó la localización mediante inmunohistoblot en secciones de cerebro de rata con suero de pacientes con encefalitis de Rasmussen y pacientes con epilepsia, observando una tinción positiva en las regiones específicas del RGlú3 y rNMDA2A/B. Sin embargo, al igual que el estudio previo, no se observaron diferencias entre el suero de pacientes con encefalitis de Rasmussen y pacientes con epilepsia focal. Además, se constató que el inmunoblot era más sensible que el ELISA¹⁵⁰.

Por este motivo, se considera que quizá estos anticuerpos estén más relacionados con el daño neuronal que con la etiología del mismo. Aunque si que se han observado anticuerpos contra receptores del glutamato tipo 3 en el suero de algunos pacientes con una encefalitis de Rasmussen, no existen series que confirmen la presencia sistemática de los mismos en series de pacientes. Se ha postulado un papel para los anticuerpos anti receptores de glutamato tipo 3 como activadores de las neuronas corticales y de la inducción de una citotoxicidad dependiente del complemento o independiente. Sin embargo, dado que los anticuerpos que se pueden encontrar en ciertos pacientes epilépticos pueden ser perjudiciales para el SNC u otros órganos periféricos, se recomienda su búsqueda y en caso de presencia positiva, intentar silenciar su actividad¹⁵¹.

d. Síndromes del sistema nervioso central y anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD)

La enzima de la descarboxilasa del ácido glutámico cataliza la producción de GABA, el principal neurotransmisor inhibitor del SNC. Los anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) se identificaron por primera vez en un paciente con un síndrome de “stiff-man” (síndrome de la persona rígida), que cursa con rigidez muscular y espasmos. Se ha descrito posteriormente en un gran número de casos de pacientes con diabetes tipo 1, y se considera actualmente como un marcador de la diabetes autoinmune.

En la Figura 8, se pueden observar las diferencias en cuanto a las concentraciones de anticuerpos anti-GAD en diferentes tipos de pacientes. Las enfermedades con síntomas neurológicos, síndrome de “stiff-man” y la ataxia cerebelosa con anticuerpos anti-GAD, presentan títulos elevados de anticuerpos anti-GAD, mientras que la diabetes mellitus autoinmune y el trastorno poliglandular autoinmune tienen títulos bajos. Esto da una imagen del espectro de trastornos asociados a la presencia de anticuerpos anti-GAD.

El **síndrome de “stiff-man”** es un trastorno poco frecuente del SNC caracterizado por una rigidez progresiva muscular grave del tronco y las extremidades inferiores asociada a espasmos dolorosos. Tiene un inicio insidioso, mayoritariamente afecta a mujeres entre la tercera y sexta década de la vida. Los síntomas pueden ser inicialmente intermitentes y se pueden exagerar las contracciones musculares en respuesta a los estímulos táctiles, eléctricos y sonoros. La contracción continua de los músculos agonistas y antagonistas causada por descargas de unidades motoras sigue siendo la característica principal de este trastorno. Debido a la asociación que se observa con el haplotipo HLA tipo DR3 o DR, la diabetes tipo I y la presencia de anticuerpos anti-GAD en el suero de estos pacientes, se cree que puede tener un origen autoinmune. Los anticuerpos anti-GAD que se observan en un 63% de pacientes; parece que están dirigidos hacia las formas conformacionales de la enzima GAD. Esta enzima se localiza en las terminaciones nerviosas gabérgicas y en las células pancreáticas tipo β . El suero que contiene anticuerpos anti-GAD se une a células tipo β pancreáticas en un 95% de los pacientes, mientras que los anticuerpos del LCR son detectables en un 80% de los pacientes. La síntesis intratecal de IgG apoya también el posible origen autoinmune. El síndrome de “stiff-man” con anticuerpos positivos se asocia con otros autoanticuerpos específicos y/o otras enfermedades autoinmunes, sobretodo la diabetes insulino-dependiente, además de la anemia perniciosa, las enfermedades autoinmunes tiroideas y la miastenia gravis. Se ha descrito un aumento de un 12% de la

prevalencia de epilepsia en el síndrome de “stiff-man”. En un estudio con 33 pacientes con el síndrome, todos aquellos que además tenían una epilepsia y una diabetes mellitus tipo I, en total 20 pacientes, presentaban anticuerpos anti-GAD¹⁵². Las manifestaciones neurológicas se explicarían por la interferencia con el neurotransmisor inhibitorio GABA. En la diabetes tipo I, se ha descrito la mejoría de estos pacientes al tratamiento con benzodiazepinas, valproato sódico y baclofeno, y en algún caso a corticoesteroides y plasmaféresis, por lo que se apoya la hipótesis de que estos anticuerpos tengan un papel patogénico¹⁵³.

La **ataxia cerebelosa** crónica se ha descrito en un grupo de pacientes, mayoritariamente mujeres, en presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-GAD séricos y en LCR¹⁵⁴. Los síntomas cerebelosos progresaban lentamente y guardaban alguna similitud con la ataxia cerebelosa tipo 2 o la degeneración cerebelosa paraneoplásica. Dada la lenta evolución de los síntomas, se excluyó un origen paraneoplásico. La mayoría de estas pacientes estaban afectadas por un **trastorno poliglandular autoinmune**, que se caracteriza por la presencia de un síndrome cerebeloso crónico (ataxia y nistagmo)¹⁵⁵ y muchas de ellas presentaban otros trastornos autoinmunes asociados. Se considera este trastorno como de etiología autoinmune, pues no sólo se ha demostrado una síntesis de anticuerpos anti-GAD (IgG) intratecalmente, sino que además se ha visto una mejoría de los síntomas tras tratamientos inmunomoduladores, lo que sugiere una relación patogénica^{154, 156}. Además, en algunos casos se ha descrito este síndrome asociado a epilepsia y mioclonias.

Recientemente, los anticuerpos anti-GAD se han descrito en pacientes con otras enfermedades como la ataxia cerebelosa, la epilepsia refractaria¹⁵⁷ y en pacientes con mioclonias¹⁵⁸. Individualmente, cada trastorno presenta además de los anticuerpos anti-GAD, otros autoanticuerpos o los pacientes están afectados por enfermedades autoinmunes órgano-específicas. Los anticuerpos anti-GAD también se han descrito en el **trastorno neurodegenerativo**

autosómico recesivo de Batten, que es un lipofuscinosis neuronal ceroides juvenil. En estos pacientes se produce una pérdida de neuronas GABAérgicas. A pesar de que el origen molecular sigue siendo desconocido, sí que se ha descrito la presencia de un autoanticuerpo contra la GAD65 en un ratón “knockout” para el gen CLN3. En este modelo animal, se ha observado como los anticuerpos anti-GAD65 inhiben la actividad de la enzima GAD, esto provoca unos niveles de glutamato elevados, que puede que tengan un papel causal en la hipertrofia astrocítica que es evidente en estos ratones¹⁵⁹.

El papel de los anticuerpos GAD en las enfermedades neurológicas todavía es incierto y la falta de modelos experimentales hace difícil la investigación de su potencial papel patógeno. Aunque, se han sugerido dos posibles mecanismos: la reducción de los anticuerpos anti-GAD de la síntesis de GABA en las terminaciones nerviosas o la interferencia con la exocitosis del GABA¹⁶⁰. Neurológicamente, el antígeno es intracelular, y es difícil comprender como estos anticuerpos anti-GAD pueden causar todas estas patologías. A nivel práctico, sería recomendable buscar anticuerpos anti-GAD en todos aquellos pacientes que presentan una ataxia cerebelosa que tienen una diabetes mellitus tipo I y otras manifestaciones autoinmunes órgano-específicas. En caso de detectarse títulos elevados de anticuerpos en suero, se debería examinar el LCR para descartar la presencia de bandas oligoclonales y síntesis intratecal de anticuerpos anti-GAD. En caso de que el LCR fuese positivo, sería muy probable encontrar una lesión cerebelosa autoinmune y se debería intentar un tratamiento inmunomodulador.

e. Síndromes del sistema nervioso central y anticuerpos anti-anfifisina

La anfifisina tipo I, es una proteína de la terminación nerviosa descubierta en 1992 por Lichte y colaboradores¹⁶¹, con un papel putativo en la endocitosis de vesículas desde la membrana plasmática inducida por una despolarización de la terminación axón tras la exocitosis de un neurotransmisor inducida por despolarización. Se describió por primera vez el anticuerpo anti-anfifisina en suero de tres mujeres con un síndrome de “stiff-man” paraneoplásico y cáncer de mama¹⁶². En los primeros estudios publicados, estos autoanticuerpos sólo se detectaron en aquellas pacientes en las que se asociaba un síndrome de “stiff-man” a un cáncer de mama, en las que no se encontraba un autoanticuerpo anti-GAD¹⁶³. A raíz de este estudio, surgieron publicaciones en las que se describía la presencia de anticuerpos anti-anfifisina en el suero de tres pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña asociado a una encefalomielitis paraneoplásica y neuropatía sensitiva (sin desarrollar un síndrome de “stiff-man”)¹⁶⁴. Posteriormente, se estudió la frecuencia de anticuerpos anti-anfifisina en una serie larga de pacientes con un SPN, para observar si estaban asociados a un tipo particular de SPN o tumor¹⁶⁵. Los resultados del estudio permitieron concluir que los anticuerpos anti-anfifisina tipo I están presentes en una frecuencia baja en pacientes con CPCP, con o sin un SPN asociado. El grupo de pacientes con mayor frecuencia de anticuerpos anti-anfifisina tipo I eran aquellos que correspondían con pacientes que tenían un SPN y un CPCP, sin anticuerpos anti-Hu. Los anticuerpos anti-anfifisina reconocían el fragmento V (terminal C) de la proteína anfifisina I. Esto ocurre tanto en aquellos pacientes con CPCP, como en aquellas con cáncer de mama.

Actualmente, se considera que hay un espectro más amplio de manifestaciones neurológicas con autoinmunidad relacionada a la anfifisina, coexistiendo en algunos casos con síndromes paraneoplásicos, especialmente con el síndrome

de “stiff-man”. En un amplio estudio donde se evaluaron 120.000 pacientes para el estudio de anticuerpos paraneoplásicos, se encontraron 63 pacientes seropositivos (71 pacientes aunque para 8 de ellos no había información clínica) para anticuerpos anti-anfifisina¹⁶⁶. Al revisar las manifestaciones clínicas se observó que la encefalomielitis con rigidez (fenómeno de persona rígida) está presente en una minoría de mujeres (39%) y hombres (12%). Sólo cumplían criterios de síndrome de “stiff-man” un 10% de mujeres y un 4% de hombres. Presentaban de forma asociada anticuerpos anti-GAD un 27% de los pacientes, sin ser los niveles de anticuerpo muy elevados como suele pasar en el síndrome de “stiff-man”. En dicho estudio, de los pacientes seropositivos para anticuerpos anti-anfifisina, 74% tenían más de un autoanticuerpo neuronal. Las neuropatías craneales, mielopatía y corea, están consideradas sindrómicas para autoinmunidad CRMP-5¹⁶⁷, la neuronopatía sensitiva y la dismotilidad gastrointestinal son sindrómicas para ANNA-1¹⁶⁸, la hiperexcitabilidad neuromuscular y la encefalitis autoinmune son sindrómicas para los anticuerpos contra canales de potasio dependientes de voltaje¹⁶⁹, y el síndrome de Eaton-Lambert para los anticuerpos contra canales de calcio tipo P/Q dependientes de voltaje¹⁷⁰. La diversidad de síntomas neurológicos que presentan los pacientes con autoinmunidad anfifisina puede explicarse por las respuestas inmunes concomitantes a múltiples antígenos onconeuronales expresados en una única neoplasia¹⁷¹. En este estudio, sólo un tercio de los pacientes tenían anticuerpos anti-anfifisina aislados. Dichos pacientes eran con mucha más frecuencia mujeres con cáncer de mama y síndrome tipo persona-rígida. Así pues, se puede concluir que la coexistencia de múltiples autoanticuerpos paraneoplásicos implica que la presentación neurológica refleja que la diana de dichos autoanticuerpos son los péptidos derivados de más de una proteína específica de neurona. Por lo tanto, a pesar de que habitualmente la presencia de anticuerpos anti-anfifisina es un indicador de un SPN, se ha considerado que dada la variabilidad de síndromes neurológicos centrales a los que se ha podido asociar, su presencia refleje una respuesta autoinmunitaria neurológica. Las

observaciones neuropatológicas apoyan el papel de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos para péptidos de la anfifisina en las manifestaciones neurológicas. Estos linfocitos son más evidentes en el parénquima que en la zona perivascular, estando en la proximidad de las neuronas. La infiltración de linfocitos y la activación acompañante de la microglia fue marcada en el tronco del encéfalo, médula espinal y ganglios del asta dorsal. Aunque habían evidencias de una respuesta inmune restringida a una zona neuroanatómica. Últimamente, se ha publicado la confirmación de que la inyección de IgG anti-anfifisina a animales de laboratorio, provoca la enfermedad. La patogenia no se comprende del todo, aunque se cree que es mediada por células B. Esto apoyaría la hipótesis del papel patogénico de anticuerpos contra la anfifisina, añadiendo pues el síndrome de “stiff-man” a los trastornos autoinmunes inmunomediados.

Los anticuerpos anti-anfifisina tipo I pueden ser útiles en predecir el origen paraneoplásico de un trastorno neurológico sin un tumor conocido, porque no se han encontrado en series amplias de pacientes la presencia de estos anticuerpos en un SPN con síntomas paraneoplásicos iniciales. Aunque, la baja incidencia de la presencia de estos anticuerpos, supone una limitación para su uso como marcador diagnóstico. Sin embargo, sí que a nivel terapéutico en el caso concreto de la presencia de anticuerpos anti-anfifisina en el síndrome de “stiff-man”, apoya el uso de la plasmaféresis u otras técnicas similares para reducir el número de anticuerpos.

2. Trastornos del SNC con anticuerpos frente a un autoantígeno desconocido.

a. *Enfermedad del sistema nervioso central post-estreptocócica*

El estreptococo del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) es un patógeno exclusivamente humano. La infección más banal causada por el *Streptococcus pyogenes* es una faringitis, tras la cual, en ciertos individuos susceptibles, se pueden desarrollar fenómenos de autoinmunidad post-infecciosa, tanto en el corazón: fiebre reumática aguda; como en las articulaciones o en el sistema nervioso central (SNC). La fiebre reumática aguda es una secuela autoinmune que se produce cuando los antígenos del estreptococo inician una serie de procesos inflamatorios. Se sabe que la inflamación cardíaca está causada por la similitud molecular de los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con epítomos en la bacteria y en el corazón.

La **corea de Sydenham**, se ha asociado a un fenómeno latente post-estreptocócico tardío. Es uno de los criterios mayores para el diagnóstico de la fiebre reumática¹⁷². A diferencia de la carditis reumática las secuelas neurológicas ocurren muchos meses después tras la infección estreptocócica inicial. Las características clínicas son la presencia de trastornos del movimiento asociados a trastornos emocionales (obsesivo-compulsivos, ansiedad, depresión mayor) y trastornos del comportamiento¹⁷³. Entre los trastornos del movimiento que se observan, se incluyen también los tics motores y la distonía. Además, en algunos pacientes se desarrollan síntomas de encefalomiелitis¹⁷⁴.

Se ha propuesto que la fisiopatología del trastorno es una disfunción inmunomediada de los ganglios basales. Los mediadores del proceso serían anticuerpos antineuronales contra ganglios basales¹⁷⁵, que están presentes, según algunos estudios, en altos porcentajes en estos pacientes (93% en la corea de Sydenham aguda y un 50% en la corea persistente)¹⁷⁶, estando los niveles de anticuerpos en relación con la actividad de la enfermedad. Existe controversia y actualmente se está profundizando en el estudio del posible papel de la autoinmunidad celular ya que algunos estudios han descrito la presencia de anticuerpos anti-neuronales¹⁷⁷. Sin embargo, el posible mecanismo fisiopatológico se basaría en que los organismos estreptocócicos presentasen una serie de proteínas que son homólogas a otras proteínas del SNC. Esto produciría una reacción cruzada entre los epítomos de las proteínas relacionadas con el estreptococo del grupo A y las proteínas neuronales, concretamente los lisogangliósidos (N-acetil- β -D-glucosamina) de la superficie de la célula neuronal¹⁷⁸, que serían los autoantígenos en este trastorno. Estos anticuerpos provocarían la inducción de la actividad de la quinasa CaM II (proteínquinasa dependiente de calcio/calmodulina), con elevación de la tirosin-hidroxilasa y con la consecuente liberación de dopamina, que puede derivar en el trastorno del movimiento característico de la enfermedad.

Previamente, se había estudiado la modulación de la función celular por autoanticuerpos en la enfermedad de Graves o en la miastenia gravis¹⁷⁹. Sin embargo, en estos casos los autoanticuerpos están dirigidos contra antígenos proteicos. En la corea de Sydenham, se hipotetiza que los autoanticuerpos estarían dirigidos contra los lípidos de membrana, que nos son típicamente conocidos como antígenos. Para identificar los antígenos diana, Kirvan y colaboradores, derivaron líneas hibridomas humanas de un paciente con una corea de Sydenham activa. Cada una de las tres líneas celulares dió lugar a anticuerpos monoclonales que reconocían a la N-acetil- β -D-glucosamina, el mayor epítomo inmunológico de la superficie de carbohidratos del grupo del

estreptococo tipo A. Estos anticuerpos reaccionaron de forma cruzada con lisogangliósidos del SNC, que sabemos que influyen en la transducción de señales nerviosas. Los anticuerpos que reaccionaban de forma cruzada estaban elevados en los episodios agudos de corea de Sydenham. Además, los anticuerpos contra la N-acetil- β -D-glucosamina se unían a secciones tisulares derivadas de los ganglios basales humanos. Finalmente, como se ha mencionado, el anticuerpo contra el lisogangliósido activaba la quinasa dependiente CaM II. Es importante recordar, que anticuerpos contra gangliósidos, incluyendo los anticuerpos monosialogangliósidos GM1 específicos, han sido descritos en otros trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré. Concretamente, en la variante del síndrome de Guillain-Barré, el síndrome de Miller-Fisher, se han descrito los anticuerpos gangliósido-específicos GQ1b, que son capaces, mediante el complemento, de ser citotóxicos en la terminación de la neurona motora¹⁸⁰.

En 1998, Swedo y colaboradores, tras una descripción de 50 casos, introdujeron el acrónimo inglés **PANDAS**, que define un **síndrome infantil con tics obsesivo-compulsivos por un proceso autoinmune post-estreptocócico**¹⁸¹. Este síndrome se acuñó cuando se observó que un 65%-100% de los niños con una corea de Sydenham presentan síntomas obsesivo-compulsivos, que se inician dos a cuatro semanas antes de los movimientos coreicos y se mantienen durante la presencia de movimientos anormales. Los pacientes además de presentar síntomas coreicos desarrollan tics motores y fónicos¹⁸², síntomas obsesivo-compulsivos, mioclonías¹⁸³ u otros síntomas similares a los observados en el trastorno por hiperactividad/déficit de atención. A pesar de que algunos autores consideran que es quizá complicado distinguir el PANDAS del síndrome de Tourette, en realidad, no siempre es así. Los criterios que definen el PANDAS y que son similares al síndrome de Tourette serían: (1) presencia de un tic o trastorno obsesivo-compulsivo; (2) edad de inicio entre los 3 años y la pubertad; (3) inicio agudo con exacerbaciones (este es el criterio más útil para

distinguir el PANDAS, pues el inicio de los tics en el síndrome de Tourette no es brusco ni al unísono para todos ellos); (4) unión temporal entre la infección estreptocócica tipo A y la exacerbación de los síntomas. Este último criterio es exclusivo del PANDAS, aunque en ciertos casos es difícil de asegurar debido a la alta prevalencia de la infección por estreptococo tipo A, y la facilidad para que pase desapercibida. El último criterio sería (5) que existiesen hallazgos neurológicos anormales. Esto también lo cumplen ambas enfermedades, aunque en el PANDAS hay presencia de movimientos coreicos en un 95% de los pacientes¹⁸⁴.

Tras la publicación de trabajos controvertidos, el PANDAS cumple algunos de los criterios para ser una enfermedad del sistema nervioso central de etiología autoinmune. Los criterios que debería cumplir serían que: (1) los anticuerpos se hubiesen identificado en el cerebro, (2) la enfermedad pudiese inducirse por la inmunización con el autoantígeno, (3) existiese un aumento de los autoanticuerpos séricos y en LCR en comparación con los controles sanos, (4) la hubiese una mejoría de los síntomas clínicos tras la reducción de anticuerpos mediante plasmaféresis, y (5) hubiese la posibilidad de inducción de la enfermedad en modelos animales por la transferencia pasiva del anticuerpo. En el PANDAS no hay evidencia que apoye los criterios 1 y 2, debido a las diferencias metodológicas de los estudios realizados. Se han descrito los primeros anticuerpos antineuronales en pacientes con PANDAS¹⁸⁵, aunque no es seguro si, en estos estudios, había diferencias entre los niveles séricos y en LCR de anticuerpos entre pacientes y controles. La inducción del síndrome en ratas tipo Fischer, se ha estudiado con microinfusiones estriatales con anticuerpos antineuronales posiblemente encontrados en el suero de pacientes con PANDAS (etiología autoinmune) y el síndrome de Tourette (no etiología autoinmune). Se estudió la presencia de marcadores inmunológicos (anticuerpos contra la proteína estreptocócica M5) y cambios en el comportamiento animal por observación y monitorización diaria¹⁸⁶. Los autores no encontraron que

hubiese ningún cambio en el comportamiento (comportamiento estereotípico, cambios episódicos...) de las ratas al comparar antes o 10 días después de las infusiones con suero de pacientes del síndrome de la Tourette o PANDAS. Esto difiere con dos estudios previos^{187,188} que, contrariamente a éste, demostraron que los animales sí que aumentaban considerablemente su comportamiento estereotípico. Esto podría ser por diferentes razones: que los anticuerpos no sean patogénicos, pero esto es difícil de determinar sin un control positivo; o por las variaciones metodológicas entre los estudios (diluciones, lugar de infusión, patrón neuronal diferente en cada patología...).

La hipótesis fisiopatológica de ambos trastornos es que mecanismos autoinmunes mediados por anticuerpos además de la infección pueden contribuir a la patogenia de algunos trastornos del movimiento y comportamiento. En la corea de Sydenham, las infecciones estreptocócicas del grupo A inducen anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con los ganglios basales del SNC y dan lugar a una activación de la quinasa CaM tipo II en las neuronas. Se ha demostrado que el suero de los pacientes con PANDAS induce niveles mayores de activación de la quinasa CaM tipo II que el suero de pacientes con tics o síndrome de hiperactividad no asociados a infecciones estreptocócicas. Aunque todavía no se ha demostrado como los anticuerpos que producen la IgG cruzan la BHE, se puede sugerir que la infección o el propio anticuerpo pueden afectar la permeabilidad de la BHE. Recientemente, se ha demostrado que incluso la noradrenalina puede afectar la BHE para permitir que penetre la IgG¹⁸⁹. El aumento de la señal de transducción altera la fisiología neuronal dando lugar a una disfunción celular. El nivel de la activación de la quinasa CaM II obtenido en un LCR PANDAS es comparable a la señal celular producida en el LCR en la corea de Sydenham. Aunque el suero de los pacientes con PANDAS induce niveles elevados de activación de CaM II, el intervalo es inferior al que se observa en el suero de los pacientes con una corea de Sydenham¹⁹⁰. Probablemente sea necesario un nivel umbral de actividad quinasa CaM II para

desarrollar un movimiento coreico, mientras que quizá niveles menores desencadenen cambios en el comportamiento. La quinasa CaM II media en muchos procesos neurológicos como: el aprendizaje, la memoria, el desarrollo neuronal, y tiene una amplia especificidad dependiente de la concentración, localización intracelular y niveles de calcio. En definitiva, es una enzima multifuncional muy concentrada en el cerebro con funciones en la neurotransmisión y excitabilidad neuronal¹⁹¹, regulación de la liberación de catecolaminas¹⁹², y la co-localización con receptores de glutamato, que están implicados en la fisiopatología de los trastornos neuropsiquiátricos¹⁹³. Es decir, que actualmente podemos inferir cómo los anticuerpos contra el epítipo estreptocócico N-acetil-beta-D-glucosamina, pueden llegar a alterar la función neuronal y provocar trastornos del movimiento y comportamiento. Sin embargo, un estudio ecocardiográfico reciente en una cohorte de pacientes con PANDAS, ha demostrado que sólo un 31% tiene afectación cardíaca, lo que quizá hace suponer que la corea de Sydenham forma parte de un trastorno multi-orgánico, mientras que el PANDAS es específico del SNC¹⁹⁴. Además del PANDAS, otros trastornos que quizá podrían ser causados tras infecciones estreptocócicas, podrían dividirse en aquellos que provocan un aumento de la excitabilidad del SNC (trastornos del movimiento hiperquinéticos, ansiedad e insomnio), o una inhibición del SNC (trastornos del movimiento hipoquinéticos, depresión e hipersomnolencia).

La **encefalitis letárgica** se describió por primera vez en 1916 por von Economo, como un trastorno del SNC que cursaba con faringitis, seguido de trastornos del sueño, signos de afectación de los ganglios basales (sobre todo parkinsonismo) y secuelas neuropsiquiátricas¹⁹⁵. Desde la epidemia de 1916-1927, sólo se han descrito casos esporádicos. Los estudios patológicos han descrito la existencia de una encefalitis del mesencéfalo y de los ganglios basales, con infiltración linfocítica (sobre todo de células plasmáticas). Dado que la epidemia descrita coincidió temporalmente con la pandemia de la gripe de 1918, algunos autores

intentaron ligar ambas enfermedades, a pesar de que von Economo, siempre consideró que se trataba de un trastorno independiente. Esto se confirmó con estudios de cerebros con encefalitis letárgica que no demostraron la presencia del ARN del virus de la gripe. Sin embargo, sí que se han encontrado bandas oligoclonales intratecales en algunos pacientes y otros se han beneficiado de tratamientos esteroideos, por lo que se ha considerado que podía tratarse de una enfermedad inmunomediada.

Un estudio de 20 casos con una clínica similar a una encefalitis letárgica (trastorno del sueño con insomnio, letargia, parkinsonismo, discinesias y síntomas neuropsiquiátricos como el mutismo, ansiedad, depresión y obsesión-compulsión), propuso que dicho síndrome podía tratarse de un fenómeno de autoinmunidad en los ganglios basales. No se encontraron evidencias de que se tratase de una encefalitis vírica ni de una enfermedad de Parkinson de inicio muy precoz. Se realizaron pruebas de neuroimagen (RM craneal), en las que el cerebro era normal en un 60% de los casos, mostrando cambios inflamatorios muy localizados en los ganglios basales en el otro 40% de los pacientes. Se estudiaron también los niveles de anti-estreptolisina-O, que estaban elevados en un 65% y, por western-blot, demostraron que el 95% de los pacientes tenía niveles de autoanticuerpos reactivos contra los ganglios basales (frente a un 2-4% de los controles sanos). Estos autoanticuerpos se encontraron en el LCR de 4 pacientes; y se unían a autoantígenos comunes neuronales, sobretudo con poblaciones neuronales más que con la glia. Aunque, no se pudo determinar si eran patogénicos directamente¹⁹⁶. En este trabajo, puede sorprender en cuanto a la recolección de casos, la alta prevalencia de la enfermedad (derivación a centros de referencia durante 3 años), la falta en los síntomas de la presencia de crisis oculogiras y oftalmoplejia, el momento del inicio del síndrome (casos entre 2 y 69 años de edad) y la diferencia en cuanto a la presencia e inicio de los síntomas psiquiátricos (al inicio y como enfermedad monofásica o como una secuela tras la enfermedad). Aunque, sobretudo se intentan buscar evidencias

para una etiología autoinmune, posiblemente post-estreptocócica. La presencia de anomalías en la neuroimagen (40%), a pesar de su desaparición parcial posterior, las bandas oligoclonales (9 de 13 examinados y en 5 exclusivamente en el LCR indicando síntesis intratecal), son hallazgos consistentes con la literatura previa¹⁹⁷. A pesar de todo, en cuatro casos las bandas oligoclonales se encontraron en suero y en el LCR, lo que sugiere también una respuesta en la periferia. Si que parece que los pacientes habían tenido una infección previa, pero es difícil de demostrar su relación directa como en el PANDAS o la corea de Sydenham.

Ya se ha comentado, la presencia de anticuerpos contra antígenos neuronales en todas estas enfermedades. La presencia de anticuerpos descritos en los pacientes con un síndrome parecido a la encefalitis letárgica, son similares a los anticuerpos anti-ganglios basales. Dichos anticuerpos se encontraron en frecuencia muy baja en el grupo control y en un 95% de los pacientes con síntomas de encefalitis letárgica y 4/5 LCR estudiados. Se unieron a diferentes bandas de polipéptidos, que según resultados del mismo grupo, eran similares a los encontrados en otras condiciones post-estreptocócicas. Esto da lugar a controversias sobre la especificidad de la enfermedad, pero es consistente con la hipótesis de que la encefalitis letárgica forma parte del espectro de los trastornos post-estreptocócicos inmunomediados de los ganglios basales. La técnica del western blot se utiliza con frecuencia para examinar la presencia de anticuerpos antineuronales, pero aunque detecta de forma eficaz los anticuerpos contra epítomos no-conformacionales, es probable que no detecte aquellos anticuerpos potencialmente patógenos que se unen a determinantes conformacionales. Por este motivo utilizan técnicas de inmunofluorescencia para demostrar la unión de los anticuerpos a axones y citoplasma neuronal. Los resultados indican la presencia de anticuerpos con diana intracelular, algo que no excluye la posibilidad que haya otros anticuerpos que se unan a la membrana neuronal. Sin embargo, pueden existir dudas sobre la especificidad regional de

los anticuerpos puesto que no se ha realizado un análisis detallado de las diferentes partes del cerebro. Por lo tanto, la especificidad neuronal y la importancia patológica están por determinar, no quedando claro si los anticuerpos reaccionan de forma cruzada con los antígenos del *streptococcus A*. Los dos criterios más convincentes de que pueda tratarse de un trastorno mediado por anticuerpos, aun y con la ausencia de la detección de anticuerpos específicos, son la respuesta al tratamiento inmunosupresor y la transferencia pasiva de la enfermedad a animales experimentales. El PANDAS ha respondido a la plasmaféresis¹⁹⁸ y los corticoesteroides han sido útiles en casos puntuales de encefalitis letárgica¹⁹⁹. Recientemente, un síndrome parecido al Tourette ha sido transferido a ratas por inyecciones intracerebrales. Si la encefalitis letárgica fuese inmunomediada debería existir una mejoría clínica con la plasmaféresis, al menos al inicio de la enfermedad, además de poder (al igual que con el PANDAS) transferir la enfermedad con suero de pacientes a animales.

Las enfermedades desglosadas nos demuestran la dificultad de identificar autoantígenos, de poder acabar de demostrar si se trata de enfermedades autoinmunes, y de si la presencia de autoanticuerpos es un simple marcador del proceso destructivo, ya sea mediado por células tipo T, debido a una toxicidad directa de los agentes infecciosos, o una señal de activación del sistema inmune.

b. *Enfermedad neurológica y el virus humano linfotrópico-T*

El virus humano linfotrópico-T tipo 1 (HTLV-1) es un retrovirus que puede causar mielopatía y paraparesia espástica tropical. Aunque se estima que hay 20 millones de afectados en las zonas endémicas, la mayoría son portadores. La mielopatía/paraparesia espástica tropical es un término que se mantiene aunque actualmente sabemos que no se trata de una enfermedad tropical. Es un trastorno neurológico definido por unos criterios clínicos y serológicos. El trastorno se manifiesta con una paraparesia espástica lentamente progresiva,

vejiga neurógena y déficits sensitivos de evolución crónica. Parece que evoluciona más rápidamente en mujeres en edad fértil, intuyéndose una afectación hormonal, y en aquellos pacientes que tienen una carga viral más elevada al inicio de la enfermedad. Otras posibles manifestaciones clínicas de la infección por HTLV-1 podrían ser: miopatía, polineuropatía, enfermedad de motoneurona, déficits cognitivos y disautonomía; presentándose éstas de forma aislada o simultáneamente²⁰⁰.

Los posibles mecanismos fisiopatológicos de la afectación del virus en el SNC, son por; (1) toxicidad directa: las células gliales presentan los antígenos virales en su superficie celular. Los linfocitos T citotóxicos CD8+ que se han generado para eliminar el virus, cruzan la BHE y atacan la célula afectada, liberando citoquinas que destruyen la célula glial. No hay evidencia directa que apoye esta teoría, pero podría ayudar en la lesión neuronal. (2) Daño colateral: este mecanismo no implica una respuesta específica frente a células del SNC. Sugiere que la presencia de células CD4+ infectadas por HTLV-1 que secretan interferón y su reconocimiento por linfocitos T citotóxicos CD8 en el SNC, inducen a la microglia a segregar citoquinas que son mielinotóxicas. (3) Autoinmunidad: supone que la célula glial, que sería el autoantígeno, fuese similar al antígeno viral. Esto provocaría que las células CD4+ activadas cruzasen la BHE, confundiesen a la célula infectada y destruyesen la célula glial. Explicando como los síntomas del SNC pueden estar mediados por autoanticuerpos dirigidos a los componentes neuronales²⁰¹. Se trata de un fenómeno de “similitud molecular”, que se caracteriza por una respuesta inmune frente a un agente exterior que reacciona de forma cruzada con el antígeno. Anticuerpos contra la proteína HTLV-1 tax reaccionan de forma cruzada con la proteína A1 nuclear ribonuclear heterogénea (hnRNP A1) que es un autoantígeno neuronal específico intracelular. A pesar de que no comparten ningún aminoácido, se propone como mecanismo de la posible reacción cruzada inmunológica a ciertos pliegues proteicos o de estructura. Se han detectado este

tipo de autoanticuerpos en suero, LCR y el el SNC. Estos anticuerpos tienen un efecto funcional en la neurona mediante una inhibición de los potenciales de acción neuronales, sin conocerse todavía la manera por la que el anticuerpo entra en la célula. Se sabe que los anticuerpos cruzan la BHE en lugares de inflamación, y en la paraparesia espástica/mielopatía se produce inflamación perivascular. Este hallazgo, nos ayuda a poder seguir investigando las reacciones cruzadas entre epítomos virales y neuronales, pues supone la existencia de una posible relación entre infecciones crónicas víricas y enfermedades autoinmunes del SNC²⁰².

III. SÍNDROMES NEUROLÓGICOS QUE PODRÍAN CONSIDERARSE CANALOPATÍAS AUTOINMUNES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Existen una serie de síndromes neurológicos causados por una disfunción adquirida de los canales dependientes de voltaje de calcio y potasio, que por su etiopatogenia podrían considerarse como autoinmunes.

1. Canalopatía autoinmune

Desde que en 1976 se descubrió el papel de los anticuerpos contra los receptores de acetilcolina en la patogenia de la miastenia gravis²⁰³, se han descrito una gran variedad de trastornos autoinmunes que afectan a la unión neuromuscular; cada uno relacionado con un anticuerpo que es específico frente a un receptor dependiente de voltaje, o un receptor tipo ligando o alguna proteína relacionada con el mismo. Esto abrió la posibilidad de que el sistema inmune generara anticuerpos que específicamente tenían afinidad por los receptores de los canales iónicos, provocando una disfunción del canal que daba lugar a una enfermedad. Los mecanismos que inician la producción de anticuerpos suelen ser desconocidos en la mayoría de los casos. Infecciones víricas o bacterianas pueden desencadenar una respuesta autoinmune contra el sistema nervioso en individuos predispuestos. En otros casos, esto es debido a la presencia de un tumor que genera un síndrome paraneoplásico, que se basa en una reacción autoinmune específica iniciada por la respuesta inmune contra el cáncer. Aunque los anticuerpos contra canales iónicos pueden ser un fenómeno paraneoplásico, la mayoría de los pacientes con canalopatías del sistema nervioso no tienen un tumor.

Se definen las canalopatías autoinmunes como un grupo de trastornos neurológicos asociados a anticuerpos contra canales iónicos específicos neuronales. La existencia de canalopatías autoinmunes en el sistema nervioso periférico ya es conocida; ahora se empiezan a describir las probables canalopatías autoinmunes en el sistema nervioso autónomo y central.

2. Canalopatías autoinmunes del sistema nervioso periférico

Se han descrito diferentes tipos de canalopatías autoinmunes del SNP, a partir del descubrimiento de los anticuerpos contra receptor nicotínico de acetilcolina, que fue lo que abrió la posibilidad a la existencia de patología inmunomediada en la unión neuromuscular. Las describiremos a continuación:

- a) Miastenia gravis asociada a receptores de acetilcolina del músculo, y la unión neuromuscular como diana autoinmune en el sistema nervioso periférico (SNP), dada la presencia de síndromes similares pero con otros receptores implicados: receptores anti-Musk.
- b) El síndrome miasténico de Eaton-Lambert (SMEL), asociado a canales de calcio dependientes de voltaje.
- c) Neuromiotonía o síndrome de Isaac, asociado a canales de potasio dependientes de voltaje.

a. *Miastenia gravis (MG)*

Es una enfermedad en la que se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra el receptor nicotínico de acetilcolina (RAcCol). Clínicamente, se define por la presencia debilidad muscular con la fatiga que, sobretodo, afecta a los

músculos oculares y proximales de las extremidades. Por este motivo, es habitual que se presente con ptosis, diplopia y fatiga muscular en las extremidades. En casos graves puede incluso complicarse con disfagia y debilidad respiratoria. El diagnóstico de la enfermedad se basa exclusivamente en los hallazgos electromiográficos (defecto en la transmisión neuromuscular) y en la presencia de un resultado positivo para anticuerpos contra RAcCol. Los anticuerpos contra los RAcCol se encuentran en un 80-85% de los pacientes con MG generalizada. En aquellos pacientes con una miastenia de afectación puramente ocular, los anticuerpos contra RAcCol sólo están presentes en un 50%. El RAcCol es un receptor de ligandos formado por una proteína pentamérica que consiste en dos subunidades $\alpha 1$ y una subunidad $\beta 1$, δ y ϵ . Aunque la presencia de anticuerpos es diagnóstica de MG, éstos también pueden encontrarse en pacientes con un timoma sin MG, en pacientes tratados con D-penicilamina o, en alguna ocasión, en madres que tienen bebés con artrogriposis. Los anticuerpos contra RAcCol reducen el número de RAcCol post-sinápticos, aumentando su internalización y degradación, por una lisis inducida por el complemento, y en menor grado por el bloqueo de la unión de la acetilcolina a los receptores o por la inhibición de la función del canal receptor de AcCol directamente. Aproximadamente, un 15% de los pacientes con un inicio de MG en la edad adulta tienen un timoma (tumor benigno aunque localmente invasivo). La presencia de un timoma, se ha asociado a otros trastornos autoinmunes. Un tercio de los pacientes con timoma tienen MG y se pueden encontrar anticuerpos anti-RAcCol en un 30%-40% de los pacientes con timoma y sin signos de MG.

La evidencia de la existencia de un papel etiológico de los anticuerpos en la enfermedad es muy clara en la miastenia gravis. Esto es por: (a) la presencia de anticuerpos contra el receptor de acetilcolina (RAcCol) que se unen más a la estructura proteica nativa que a cadenas de polipéptidos recombinantes, (b) la alteración del número o función de los RAcCol en los modelos de cultivos

celulares por los anticuerpos IgG del paciente, (c) la transferencia pasiva de signos o evidencia electrofisiológica de la enfermedad a animales experimentales con la inyección de la IgG de un paciente con MG²⁰⁴, (d) la mejoría de los síntomas de la enfermedad tras la plasmaféresis, y (e) la aparición de la enfermedad de forma experimental tras la inmunización activa contra los RAcCol purificados. Todos estos criterios son los necesarios según Rose y Bona (criterios modificados de Witebsky) que deben cumplirse para poder llamar a una enfermedad autoinmune²⁰⁵. Se considera pues que es una enfermedad mediada por células B. Los anticuerpos contra el RacCol se unen en la unión neuromuscular post-sináptica, provocando una internalización y degradación del receptor. La activación del complemento lesiona la membrana post-sináptica. La presencia de un número disminuido de receptores reduce la efectividad de la cantidad normal de acetilcolina liberada en la unión neuromuscular para contraer el músculo. La patogenia de la miastenia gravis inducida por un timoma es algo diferente de la no está asociada a un timoma. La MG asociada a timoma contiene células T autoreactivas con especificidad para las subunidades α y ϵ del receptor de acetilcolina. Las células T parecen estar sintetizadas por timopoyesis intratumoral. La MG asociada a timoma exporta células T CD4+, un fenómeno que tiene relevancia patológica. Además, esta MG exhibe una expresión reducida del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 en las células neoplásicas²⁰⁶.

En un grupo reducido de pacientes, especialmente aquellos con una MG oculobulbar se han encontrado otro tipo de anticuerpos, que son contra una quinasa específica del músculo (anti-MuSK). El papel patogénico de este anticuerpo todavía no está tan claro. In vitro, se ha demostrado que la IgG de pacientes con MG y con anticuerpos anti-MuSK, tiene un papel principal en la inhibición de miotúbulos inducida por agrina en la unión neuromuscular en desarrollo²⁰⁷ aunque no queda claro la función que tiene en el adulto.

A partir de estos hallazgos con la MG, la **unión neuromuscular** ha sido un lugar de estudio que ha ayudado a establecer la relación entre anticuerpos y enfermedad autoinmune. La evidencia de que existía patología autoinmune a nivel de la unión neuromuscular vino de las observaciones clínicas basadas en: (1) un aumento de la incidencia de la presencia de otras enfermedades autoinmunes y de autoanticuerpos, (2) la asociación de patología autoinmune con tumores, como el timoma (MG y neuromiotonía) y el cáncer de pulmón de célula pequeña (SMEL), (3) la transmisión de anticuerpos y fenotipo clínico de la madre al feto, y (4) la respuesta positiva a los tratamientos inmunomoduladores diseñados para disminuir los niveles de anticuerpos.

Los receptores gangliónicos nicotínicos de acetilcolina median la transmisión sináptica rápida en todos los ganglios periféricos autonómicos (simpáticos, parasimpáticos y entéricos). Estos receptores colinérgicos son homólogos pero genética e inmunológicamente distintos de los receptores en la unión neuromuscular. Los receptores de acetilcolina en las neuronas autónomas se componen de dos subunidades α^3 en combinación con tres subunidades β .

b. Ganglionopatía autónoma autoinmune

Es una forma adquirida de disfunción autónoma en adultos, que parece que es debido a la disrupción de la transmisión sináptica en los ganglios autónomos. Más de un 50% de los pacientes con disfunción autónoma aguda o subaguda tienen títulos elevados de anticuerpos dirigidos contra el receptor gangliónico de acetilcolina tipo α^{3208} . Las características clínicas de la ganglionopatía autónoma autoinmune (también denominada neuropatía autónoma autoinmune, neuropatía autónoma idiopática o pandisautonomía aguda) reflejan una alteración global de la función simpática y parasimpática preservándose la función de las fibras somáticas. Los síntomas se desarrollan en días o meses en individuos de todas las edades y género. Aproximadamente un 15% de los pacientes tienen una

ganglionopatía autónoma paraneoplásica habitualmente asociada a un CPCP o un timoma. Se ha descrito en un 60% de los casos un antecedente de infección vírica²⁰⁹. Los pacientes se presentan con hipotensión ortoestática, incapacidad para sudar, reducción del lagrimeo y salivación, alteraciones intestinales (íleo, cólicos, diarrea o estreñimiento), vejiga átona, impotencia y un ritmo cardíaco fijo. Los síntomas más frecuentes que se presentan en un 70% de los pacientes son hipotensión ortoestática y la disfunción intestinal. La presencia de pupilas atónicas que no reaccionan al reflejo lumínico, en el contexto de otros síntomas, debería hacer pensar en esta entidad²¹⁰. Los niveles de anticuerpos séricos contra el receptor de acetilcolina son proporcionales a la gravedad de los síntomas y una disminución de los mismos está relacionada con una mejoría en la enfermedad. Los hallazgos que ayudan a confirmar la etiología autoinmune son que la ganglionopatía autónoma autoinmune puede reproducirse en conejos al inmunizarlos contra los receptores gangliónicos de acetilcolina²¹¹ y la administración de anticuerpos contra dichos receptores a ratones resulta en una disfunción autonómica²¹². Por lo tanto, los anticuerpos contra los receptores de acetilcolina gangliónicos producen una alteración en la transmisión sináptica gangliónica reduciendo el número de receptores en las sinápsis del sistema nervioso autónomo.

c. Síndrome de Eaton-Lambert (SMEL)

Es un trastorno neuromuscular presináptico, en el que hay una alteración en la liberación de acetilcolina. Se caracteriza por debilidad muscular y fatiga, con diferencias respecto a la miastenia gravis. La debilidad muscular afecta al tronco y la zona proximal de las extremidades y de forma menos frecuente a los músculos bulbares u oculares. La debilidad es mayor en la contracción inicial y mejora con la estimulación repetitiva. Es frecuente que los pacientes presenten síntomas autonómicos como sequedad de boca, estreñimiento e impotencia en hombres. La alteración de los canales de calcio de las terminaciones motoras

axonales, a través de mecanismos autoinmunes con o sin un origen paraneoplásico, causa la disfunción característica del síndrome miasténico de Eaton-Lambert, que es el trastorno de los canales de calcio mejor estudiado²¹³. Se caracteriza por una disminución en la liberación evocada de acetilcolina y la disrupción de las zonas activas, aquellas donde se cree que se libera la acetilcolina. En el SMEL, existen una serie de autoanticuerpos circulantes que están específicamente dirigidos a los canales de calcio localizados en las zonas activas de las terminaciones nerviosas motoras tipo P/Q y por lo tanto, están implicados en la liberación de acetilcolina²¹⁴. Sin embargo, también se ha postulado que otras proteínas presinápticas podrían ser la diana de los autoanticuerpos.

El SMEL es el síndrome paraneoplásico clásico más conocido. La prevalencia en pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) varía de un 0% a un 6%. En un 40% a un 60% de los pacientes con SMEL, el tumor (normalmente un CPCP) es la causa subyacente. En otros pacientes (frecuentemente mujeres) no hay tumor, pero el anticuerpo es el mismo. En pacientes sin cáncer, el SMEL se asocia a enfermedades familiares autoinmunes con una preponderancia de herencia materna²¹⁵; siendo el haplotipo HLA-B8 el más representado. Si este haplotipo está presente, esto predice la ausencia de CPCP²¹⁶. Cuando la degeneración paraneoplásica cerebelosa (DCP) es por un CPCP, esto también puede asociarse a un SMEL²¹⁷. En los pacientes con un tumor diagnosticado, se cree que la enfermedad ocurre como resultado de una respuesta inmune dirigida inicialmente contra los canales de calcio dependientes de voltaje de las células del tumor de pulmón²¹⁸.

El diagnóstico del SMEL se basa en la clínica que refiere el paciente, aunque en la mayoría de casos, los síntomas suelen parecer desproporcionados a los signos encontrados en la exploración. Los síntomas habitualmente preceden al diagnóstico del tumor. Se confirma mediante análisis de anticuerpos y la

presencia de cambios electromiográficos característicos en los que tras una estimulación nerviosa repetitiva, mejora el defecto de transmisión. Los anticuerpos contra los canales de calcio dependientes de voltaje tipo P/Q (VGCC) se encuentran en más de un 85% de los pacientes con SMEL. También se pueden encontrar anticuerpos contra los canales VGCC tipo N, pero éstos no son específicos para el SMEL. Según el estudio publicado por Lennon y colaboradores, si se tiene un SMEL y un CPCP, un 100% de los pacientes presenta anticuerpos anti-VGCC tipo P/Q. Si el paciente sólo está diagnosticado de un SMEL sin cáncer, un 91% de los pacientes tiene anticuerpos anti VGCC tipo P/Q. Voltz y colaboradores han publicado las siguientes recomendaciones:

- los anticuerpos contra VGCC tipo P/Q están ausentes en los síndromes paraneoplásicos del SNC cuando no hay un tumor tipo CPCP.
- La detección de los anticuerpos contra VGCC tipo P/Q debería realizarse en todos los pacientes con un síndrome paraneoplásico del SNC cuando se observa un CPCP o anticuerpos anti-Hu+.
- La presencia de unos anticuerpos contra VGCC tipo P/Q positivos en pacientes con un síndrome paraneoplásico del SNC, sugiere que el tumor que lo provoca es un CPCP, y además estos pacientes tienen muchas probabilidades de sufrir un SMEL.

La patogenicidad de los anticuerpos anti-VGCC tipo P/Q se ha demostrado en modelos animales de SMEL. La transferencia pasiva a ratones de anticuerpos IgG extraídos con plasmaféresis de pacientes afectados con SMEL, produce déficits neuromusculares típicos^{219, 220} y cambios autonómicos²²¹. La unión de los anticuerpos reduce el número de VGCC funcionales en la terminación nerviosa motora. Esto resulta en una reducción de la liberación de acetilcolina con cada potencial de acción nervioso y en la placa motora. Durante el ejercicio o con estimulación a alta frecuencia, el calcio se acumula en la terminación de la terminación motora y puede de manera transitoria sobreponer el déficit presináptico, correlacionándose con la facilitación electrofisiológica. Se postula

que el SMEL es una enfermedad mediada por células B. Todos los CPCP expresan los VGCC tipo P/Q, pero sólo algunos pacientes desarrollan una respuesta inmunológica caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-VGCC tipo P/Q. Los anticuerpos se unen a los canales VGCC tipo P/Q que es la zona activa de la unión colinérgica presináptica, evitando la entrada de calcio en el axon terminal cuando el potencial de acción llega a la sinápsis presináptica. El calcio es necesario para la liberación de acetilcolina, su acción es mediada por la sinaptogamina-1, que es una proteína abundante de las vesículas sinápticas²²². La fisiopatología humoral se ha demostrado también por la buena respuesta clínica a las plasmaféresis. Así pues, el SMEL cumple todos los criterios para ser una enfermedad mediada por anticuerpos²²³.

Cabe mencionar que como todos los síndromes paraneoplásicos, el SMEL asociado a un tumor, mejora definitivamente con el diagnóstico y tratamiento del mismo. Gracias a que los síntomas neurológicos preceden al diagnóstico tumoral, y quizá porque la respuesta inmune no permite el desarrollo rápido del tumor, el tratamiento del cáncer augura una buena supervivencia del paciente. Se ha estudiado la evolución y pronóstico de padecer un SMEL no asociado a un CPCP y éste es bueno, aunque depende de la administración al paciente de altas dosis de inmunosupresores. En los casos de SMEL no paraneoplásico, sólo las mediciones iniciales de la fuerza muscular en el electromiograma, y no los niveles de anticuerpos anti VGCC tipo P/Q, son predictores de la evolución final de la enfermedad²²⁴.

d. Neuromiotonía o síndrome de Isaac

Es un trastorno adquirido que se caracteriza por un inicio subagudo de hiperactividad de la fibra muscular que da lugar a dolor muscular y fasciculaciones, y a menudo pseudomiotonía o mioquimias, hipertrofia muscular, pérdida de peso e hiperhidrosis. Clínicamente, afecta al SNP, al sistema

nervioso autónomo y al SNC. Se diagnostica mediante la detección de dobletes o tripletes de descargas de unidades motoras de alta frecuencia. Este aumento se puede antagonizar con curare, pero no desaparece con el sueño²²⁵. En la mayoría de los casos, las descargas se inhiben mediante un bloqueo proximal del nervio, aunque un bloqueo distal no siempre previene o reduce la incidencia de cambios neuromiotónicos, sugiriendo que las descargas neuromiotónicas quizá se inician en el tronco del nervio, cuando en otros casos quizá se originen en las terminaciones motoras²²⁶. Es una variante de los síndromes de hiperexcitabilidad de nervio periférico, y puede estar asociada a una afectación del SNC en algunos pacientes, que sufren un trastorno que se conoce como la corea fibrilar de Morvan²²⁷.

La neuromiotonía se ha descrito de forma aislada o de manera asociada a otros trastornos. En muchos casos parece que tenga un origen autoinmune o paraneoplásico, se ha asociado a miastenia gravis, timoma y CPCP²²⁸; además de haber sido descrita asociada a esclerosis múltiple²²⁹ o tras un trasplante de médula ósea²³⁰. Otros tumores a los que se ha asociado son el linfoma de Hodgkin, el carcinoma bronquial y el plasmocitoma asociado a una paraproteinemia por IgM. La descripción de la asociación con anticuerpos contra los canales de potasio dependientes de voltaje (VGKC), provocando una reducción funcional de los VGKC, con un aumento de la hiperexcitabilidad y liberación de acetilcolina, no llegó hasta 1995²³¹. Se estudiaron in vitro con líneas celulares, utilizando suero de pacientes con neuromiotonía adquirida, observando una reducción de los VGKC. Aproximadamente un 45% de los pacientes con neuromiotonía tienen anticuerpos contra los VGCC. Los anticuerpos anti-Kv1.6 y anti-Kv1.2 parecen ser los más relevantes en esta enfermedad, porque los canales VGCC tipo Kv1.6 se expresan en axones intramusculares cerca de la unión neuromuscular y los Kv1.2 están localizados en la región yuxtaparanodal del axón²³². Estos VGKC repolarizan el axón y previenen la generación de potenciales de acción especialmente a medida que

la onda de despolarización entra la terminal motora del axón. Las evidencias que apoyarían la hipótesis fisiopatológica autoinmune, serían: (1) la mayor asociación con enfermedades autoinmunes (miastenia gravis y timoma); (2) la respuesta a la plasmaféresis; (3) la transferencia pasiva de estas enfermedades a animales experimentales a través del uso de plasma de pacientes o de inmunoglobulinas; (4) la acción de su suero sobre corrientes de VGKC estudiadas in vitro, y (5) la presencia en muchos pacientes de anticuerpos IgG contra los VGKC²³³.

Antes de iniciar el estudio de esta tesis, existían evidencias que ciertos síndromes del SNC podían ser autoinmunes, mediados por la disfunción del canal dependiente de voltaje de calcio o potasio. Esto se podía evidenciar mediante la asociación entre la degeneración paraneoplásica cerebelosa y el SMEL. Pudiéndose sugerir entonces ciertos trastornos neurológicos como posibles candidatos a ser canalopatías autoinmunes del SNC:

- a) degeneración cerebelosa paraneoplásica subaguda: por su asociación al SMEL;
- b) síndrome de Morvan: por la afectación tanto del SNP como del SNC;
- c) encefalitis límbica: dada la descripción de la presencia de casos aislados de encefalitis límbica idiopática.

3. Canalopatías autoinmunes del sistema nervioso central

a. Degeneración cerebelosa paraneoplásica subaguda (DCP)

Es un síndrome paraneoplásico que asocia ataxia, disartria, nistagmo vertical, diplopia y vértigo. Se describió por primera vez en 1919²³⁴, cuando un paciente con un síndrome cerebeloso rápidamente progresivo murió, encontrándose en la autopsia una pérdida de células de Purkinje en el cerebelo, además de la

presencia de un cáncer pélvico. A pesar de esto, sólo se relacionó el síndrome neurológico con el cáncer en 1938²³⁵; y las características clínicas se describieron en 1951²³⁶. Es el síndrome paraneoplásico mejor caracterizado y más reconocible. Habitualmente se asocia a un cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP), aunque puede estar asociado con cualquier tumor, como los cánceres ginecológicos (sobretudo ovario), linfomas (especialmente la enfermedad de Hodgkin). Las características clínicas se inician frecuentemente de forma brusca con mareo, náuseas y vómitos, diplopia y progresan con ataxia de la marcha y extremidades, disartria y disfagia. El nistagmo con oscilopsia es frecuente. Los signos cerebelosos acaban estabilizándose, en ese momento la mayoría de los pacientes están discapacitados para caminar, escribir, hablar y comer de forma independiente. Según el Comité Europeo de Síndromes Neurológicos Paraneoplásicos se necesita que la degeneración cerebelosa subaguda tenga las siguientes características: desarrollo en menos de 12 semanas de un síndrome pancerebeloso severo sin evidencia por RM de atrofia cerebelosa respecto a la edad del paciente, la gravedad del síndrome cerebeloso debe causar una puntuación en la escala Rankin de al menos 3 (es decir, que los síntomas afecten la calidad de vida del paciente). En el primer estadio del síndrome, puede estar presente una ataxia aislada pero la evidencia clínica de disfunción cerebelosa hemisférica es necesaria para el diagnóstico. La presencia de síntomas o signos fuera del cerebelo no es infrecuente y no descarta el diagnóstico²³⁷. Como mencionan los criterios del Comité Europeo de Síndromes Neurológicos, en las fases iniciales de la DCP, la RM cerebral es normal o puede en algún caso mostrar una leve hiperintensidad en la RM potenciada con gadolinio. A medida que la enfermedad progresa, se desarrolla una atrofia cerebelosa. La DCP puede ocurrir como síndrome aislado o en asociación con síntomas de afectación del SNC más global (encefalomielitis).

La mayoría de anticuerpos antineuronales se han descrito asociados a la DCP, especialmente los anti-Hu²³⁸, aunque hay pacientes a los que no se les identifica

un anticuerpo sérico. Los marcadores serológicos que identifican a un paciente con una DCP aislada son los anticuerpos anti-Yo²³⁹, anti-Tr²⁴⁰, anti-VGCC y anti-Zic²⁴¹ (ver Tabla 13).

Tabla 13. Anticuerpos y tumores asociados con la degeneración cerebelosa paraneoplásica (DCP) (según Shams'ili *et al.*, 2003²³⁷)

Anticuerpo	Tumor Asociado	Comentarios
Anti-Hu (ANNA-1)	Cáncer pulmón células pequeñas (CPCP)	DCP y EMP (encefalomielitis paraneoplásica), encefalitis límbica, encefalitis de tronco, disfunción autonómica
Anti-Yo (PCA-1)	Cc. Ginecológico, mama	DCP
Anti-Ri (ANNA-2)	Cc. Mama, ginecológico, CPCP	DCP, encefalitis tronco, opsoclonus-mioclonus
Anti-Tr	Linfoma Hodgkin	DCP
Anti-CV2/CRMP5	CPCP, timoma	DCP, EMP, corea, neuropatía periférica
Anti-Ma1	CPCP, otros tumores sólidos	DCP (ocasional), encefalitis límbica, hipotalámica, tronco
Anticuerpos caracterizados parcialmente		
Anti-Zic 4	CPCP	DCP
mGluR1	Linfoma Hodgkin	DCP

Sin embargo, entre un 30% y un 40% de los pacientes con DCP, no presentan anticuerpos antineuronales y el diagnóstico definitivo se basa en la exclusión de otras etiologías o en la demostración de un cáncer. La presencia de diferentes

anticuerpos antineuronales asociados a la DCP y a los diferentes tumores, sugiere que diferentes mecanismos inmunológicos pueden resultar en el mismo síndrome neurológico.

En pacientes con un CPCP, la DCP puede cursar con o sin anticuerpos anti-Hu, indicando que pacientes con el mismo tumor pueden desarrollar o no una DCP por diferentes mecanismos inmunológicos. Además, la DCP puede ocurrir asociada al SMEL. Se estudió la relación entre los anticuerpos anti-Hu, el CPCP y la presencia de SMEL en un grupo de 57 pacientes, concluyéndose que en pacientes con un CPCP y una DCP: (1) los anticuerpos anti-Hu pueden estar o no presentes a niveles elevados (44% tenían títulos elevados, 7% tenían títulos bajos, y 49% no tenían anticuerpos anti-Hu); (2) al menos un 16% de los pacientes tenían un SMEL, independientemente de la presencia de anticuerpos anti-Hu; (3) todos los pacientes con un SMEL tenían anticuerpos anti-VGCC tipo P/Q; (4) un 20% de pacientes con una DCP anti-Hu negativos sin un SMEL identificado, también tenían anticuerpos anti-VGCC tipo P/Q, sugiriendo que tenían un SMEL subclínico; (5) los pacientes con una DCP anti-Hu positivos eran con más frecuencia mujeres, tenían una enfermedad multifocal, estaban muy discapacitados, o fallecían por causa neurológica; (6) independientemente de la serología y la causa de la muerte, los pacientes con una DCP que recibieron un tratamiento para el CPCP fallecían antes que aquellos con un CPCP sin una DCP; y (8) los infiltrados inflamatorios eran mucho más prominentes en los pacientes con una DCP y anticuerpos anti-Hu positivos, en comparación con aquellos que no presentaban estos anticuerpos. Por otro lado, los anticuerpos anti-Hu causan una DCP como parte de un síndrome encefalomiélico. En algunos pacientes, los síntomas cerebelosos son muy evidentes y en otros, la neuronopatía sensitiva es tan prominente que, es difícil diferenciar el origen de la ataxia. La encefalomielitis puede afectar a cualquier parte del sistema nervioso. La mayoría de los pacientes tienen un CPCP y anticuerpos anti-Hu, un 15% de éstos, desarrollan marcados signos cerebelosos.

La fisiopatología de la DCP es desconocida. La IgG anti-Yo inyectada en el LCR de animales experimentales reacciona con las células de Purkinje del cerebelo, pero no reproduce el síndrome neurológico²⁴². Incluso, la inyección de gammaglobulinas en estos animales, da lugar al mismo fenómeno²⁴³. In vitro, el anticuerpo anti-Yo IgG no elimina las neuronas pero sí que induce la expresión de moléculas de adhesión y parece que también acelera la diferenciación neuronal²⁴⁴. Por lo tanto, no parece que la DCP sea un trastorno mediado exclusivamente por anticuerpos.

Los canales VGCC no están únicamente presentes en la terminal nerviosa motora presináptica sino que, se identificaron primero en las células de Purkinje del cerebelo. En pacientes individuales y en series de pacientes, el SMEL se ha asociado con la ataxia cerebelosa en más proporción que la esperada por mera casualidad. Los pacientes con ataxia y SMEL casi siempre tienen un CPCP y niveles elevados de anticuerpos anti-VGCC tipo P/Q. Por lo tanto, los anticuerpos anti-VGCC son un marcador serológico de la DCP asociada a CPCP. El hallazgo de estos anticuerpos debería hacer que se descartase un CPCP. Los hallazgos post-mortem de estos pacientes muestran una pérdida de células de Purkinje y una gliosis cerebelosa cortical²⁴⁵. Aunque actualmente no hay evidencia de que los anticuerpos anti-VGCC séricos puedan directamente afectar la función de las neuronas cerebelosas, especialmente con una BHE intacta.

b. Síndrome de Morvan

Este síndrome fue descrito en 1890 por Morvan, y consiste en una combinación de neuromiotonía adquirida, hiperactividad autonómica y encefalopatía fluctuante. La mioquimia, la rigidez muscular y la hiperhidrosis son similares al síndrome de Isaac, pero la disfunción del sistema autonómico y los síntomas sensitivos (dolor) son más prominentes. Es característica la presencia de un

trastorno cognitivo caracterizado por episodios de desorientación con alucinaciones y disfunción de la memoria a corto plazo. Se asocia a insomnio grave y pérdida de peso. En algunos casos, estudios polisomnográficos han demostrado una ausencia completa de sueño. Si aparece el sueño, hay presencia de trastorno del comportamiento del sueño REM y alteraciones en la arquitectura del mismo. La RM craneal no muestra anomalías significativas, algo que ayuda a diferenciar este síndrome de la encefalitis límbica²⁴⁶.

La mayoría de los pacientes son hombres. Como la neuromiotonía, se asocia con la presencia de un timoma, una miastenia gravis o un CPCP. En un artículo publicado por Liguori y colaboradores se describe un caso de síndrome de Morvan en el que existe una gran afectación del sistema nervioso periférico (neuromiotonía) y autonómico (arritmias cardíacas, estreñimiento, incontinencia urinaria, hiperhidrosis, lagrimeo, salivación) y del SNC (desorientación témporo-espacial, alucinaciones, alteración de la memoria reciente, insomnio y alteración del sueño). Esto se asoció a la presencia de anticuerpos contra los VGKC (al igual que lo que ocurre en una neuromiotonía), pero que en este caso, se demostró cómo los anticuerpos tenían afinidad por el sistema límbico²⁴⁷. Parece ser que los anticuerpos juegan un papel importante pero, no son la única fuente patógena. Otro neurotransmisor que está elevado en el paciente descrito era la noradrenalina, que probablemente también reflejaba la hiperactividad simpática observada. Además los anticuerpos séricos del paciente se unían al hipocampo en una distribución similar a la de los anticuerpos anti-VGKC. Los síntomas de disminución de la vigilancia, desorientación y “psicosis” son similares a los de una encefalitis límbica, aunque en el momento que se publicó este artículo en el 2001, sólo se había publicado la observación hecha por Buckley y colaboradores²⁴⁸.

La fisiopatología del síndrome es desconocida. La mayoría de pacientes tienen anticuerpos anti-VGKC²⁴⁹. Tanto los síntomas centrales como los

neuromusculares y autonómicos mejoran con tratamiento inmunomodulador, incluyendo la plasmaféresis, sugiriendo que éste es también un trastorno autoinmune mediado por anticuerpos²⁵⁰. Esto se apoya por un estudio experimental en el que al añadir la IgG de los anticuerpos anti-VGKC a una línea celular NB-1, se redujeron las corrientes de potasio independientemente de la adición del complemento, sugiriendo que la unión cruzada del canal por el anticuerpo puede ser un mecanismo fisiopatológico del síndrome.

c. Encefalitis límbica

La encefalitis límbica se caracteriza por un inicio subagudo (en días o hasta 12 semanas) de agitación, desorientación, pérdida de memoria reciente, alucinaciones y crisis epilépticas del lóbulo temporal. Puede ocurrir de forma esporádica o como manifestación paraneoplásica. Una de las presentaciones clínicas más habituales es la encefalomielitis paraneoplásica²⁵¹, es decir, un efecto de un cáncer posiblemente asociado con anticuerpos anti-neuronales (especialmente los anti-Hu).

El diagnóstico definitivo de una encefalitis límbica debe incluir evidencia neuro-radiológica (RM en secuencias T2 o FLAIR, SPECT, PET en la que se observa la zona temporal hipermetabólica) o neuropatológica de afectación del sistema límbico (lóbulos temporales medios). El líquido cefalorraquídeo (LCR) está afectado en un 80% de los casos, y se utiliza para reforzar el diagnóstico. El electroencefalograma (EEG) suele demostrar descargas epilépticas uni o bilaterales en los lóbulos temporales o la presencia de una actividad de reposo más lenta. La combinación de estas técnicas diagnósticas, asociada a la detección de anticuerpos antineuronales debe ayudar en el diagnóstico de este síndrome. Sin duda, debe descartarse la encefalitis vírica. En el año 2001, se describieron 5 pacientes trasplantados de médula ósea, que desarrollaron síntomas compatibles con una encefalitis límbica. Los estudios de LCR revelaron

la existencia del virus del herpes humano tipo 6, variante B, en los 3 pacientes a los que se les practicó la punción lumbar²⁵². Esto empezaba a abrir el abanico etiológico de una manifestación que se creía relacionada con neoplasias hacia posibles causas secundarias a una infección por un virus, con clara implicación del lóbulo temporal y esclerosis del hipocampo. Es decir, que quizá la encefalitis límbica podía tener un origen paraneoplásico pero también infeccioso, autoinmune o idiopático. Esto debe incluirse en el diagnóstico diferencial.

La encefalitis límbica se asocia con una serie de anticuerpos antineuronales. Aunque, aproximadamente un 40% de los pacientes con encefalitis paraneoplásica son seronegativos o tienen anticuerpos que no se pueden caracterizar. En un principio, se asoció al cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP). En 1997, Alamovitch y colaboradores publicaron una serie en la que se estudiaban las diferencias entre los pacientes con o sin anticuerpos anti-Hu y la presencia de encefalitis límbica asociada a CPCP²⁵³. En este estudio se concluyó que la ausencia de anticuerpos anti-Hu no descartaba la presencia de un CPCP, en los pacientes que tienen un diagnóstico de encefalitis límbica. Además, aquellos pacientes sin anticuerpos antineuronales, parecían mejorar más con el tratamiento oncológico y tenían menos síntomas paraneoplásicos.

En 1999, Voltz y colaboradores publicaron un estudio en el que observaron en pacientes que presentaban una encefalitis límbica, con o sin disfunción del tronco del encéfalo, y un cáncer testicular, la presencia de un nuevo anticuerpo antineuronal que denominaron anti-Ma2²⁵⁴. Posteriormente, se describió la presencia del anticuerpo onconeuronal anti-Ma2, en pacientes con encefalitis límbica y cáncer de mama²⁵⁵. Además, el grupo de Lennon, describió un nuevo anticuerpo antineuronal nuclear, el ANNA 3 (variación del anti-Hu), como marcador de síndromes autoinmunes y cáncer de pulmón²⁵⁶. Entre los síndromes paraneoplásicos descritos destacaba también un paciente con encefalitis límbica.

Gultekin y colaboradores, revisaron su serie y la publicada en la literatura anglosajona de todos los síndromes paraneoplásicos que cursaban con una encefalitis límbica²⁵⁷. Así se hizo una relación de los tumores que causaban una encefalitis límbica y los síntomas más asociados a este trastorno. Revisando la serie publicada por Gultekin y otra revisión de la literatura médica hasta el año 2000, las neoplasias asociadas a una encefalitis límbica son: cáncer de pulmón de célula pequeña (50%-59%), cáncer de pulmón sin célula pequeña (40%-54%), tumores testiculares de línea germinal (20%-6%), cáncer de mama (8%-3%), linfoma de Hodgkin (4%-7%), teratoma inmaduro de ovario (4%-3%), timoma (2%-7%), otros (8%-15%) entre los que se incluían; adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de ovario, leucemia mieloide crónica, una discrasia de células plasmáticas, carcinomas de esófago, cáncer de próstata de célula pequeña, cáncer vesical, cáncer renal, neuroblastoma, tumor mediastínico de célula germinal.

Finalmente, en el año 2002 se describieron varios anticuerpos nuevos asociados a la encefalitis límbica. El grupo de Dalmau presentó un caso de encefalitis de tronco con anticuerpos anti-Ri²⁵⁸, y el grupo de Dorresteijn publicó un caso en el que los síntomas de encefalitis límbica estaban asociados a anticuerpos anti-anfifisina (normalmente presentes en el síndrome de “stiff-man” asociado al cáncer de mama)²⁵⁹. Es decir, que hay múltiples anticuerpos antineuronales que están implicados en el desarrollo o sirven como marcador en la encefalitis límbica paraneoplásica.

Dada la similitud de algunos de los síntomas que presentan el síndrome de Morvan y el timoma/miastenia gravis, Buckley y colaboradores buscaron la presencia de anticuerpos séricos contra VGKC en dos pacientes con encefalitis límbica, uno de los cuales tenía una miastenia gravis y un timoma recurrente. En el paciente con miastenia gravis y timoma, demostraron la existencia de

anticuerpos contra VGKC. Los niveles de anticuerpos anti-VGKC aumentaron espectacularmente durante la recurrencia de su timoma, algo que no había podido detectarse en los primeros 10 años de su enfermedad (suero guardado). Tras una plasmaféresis, no sólo mejoraron los síntomas, sino que además disminuyeron los niveles de anticuerpos contra la acetilcolina y contra los VGKC. En el segundo paciente, también se encontraron niveles de anticuerpos contra los VGKC muy elevados. Técnicas inmunohistoquímicas mostraron una tinción de la capa molecular del giro dentado, con suero tomado durante la primera etapa de su enfermedad, no ocurriendo lo mismo durante la etapa de convalecencia. Por lo tanto, en este primer trabajo donde se observaron estos hallazgos, se concluyó que la encefalitis límbica podía estar causada por los elevados niveles de anticuerpos contra los VGKC. Los 2 pacientes mencionados no tenían síntomas periféricos como neuromiotonía o neuromioquimia, pero no se practicaron estudios electromiográficos. Aunque no se conoce la acción patógena de estos anticuerpos en el SNC, se ha demostrado “in vitro” que estos anticuerpos se asocian al hipocampo, aunque queda por determinar su acción “in vivo”²⁶⁰.

Tabla 14. Anticuerpos y tumores asociados con la encefalitis límbica
(según Bataller y Dalmau, 2004 ²⁶¹)

Anticuerpo	Tumor Asociado	Comentarios
Anti-Hu (ANNA-1)	Cáncer pulmón células pequeñas (CPCP)	Encefalitis límbica, de tronco, encefalomiелitis paraneoplásica, DCP, disfunción autonómica
Anti-Ri (ANNA-2)	Cc. Mama, ginecológico, CPCP	Encefalitis límbica y de tronco, opsoclonus-mioclonus
Anti-CV2/CRMP5	CPCP, timoma	Encefalomiелitis paraneoplásica, corea, neuropatía periférica, DCP
Anti-Ma2	Cc. Germinal de testículos, otros tumores sólidos	Encefalitis límbica, hipotalámica y de tronco
Anti-anfifisina	CPCP	Encefalomiелitis paraneoplásica, síndrome "stiff-man"
Anti-VGKC	Timoma, otros	Anticuerpo con o sin asociación paraneoplásica

Estos mismos canales que hemos estudiado por causar enfermedades autoinmunes pueden dejar de funcionar por causas genéticas lo que da lugar a otro tipo de enfermedades. La tabla a continuación compara de manera sencilla, cómo el mismo canal puede estar afectado por una etiología genética, o por una etiología autoinmune, dando lugar a diferentes tipos de enfermedades.

Tabla 15. Comparación entre canalopatías genéticas y autoinmunes
(modificada según Graves y Hanna, 2005 ²⁶²)

Canal iónico	Enfermedad genética	Características clínicas	Enfermedad autoinmune	Características clínicas
Canal de calcio dependiente de voltaje tipo P/Q	Migraña hemipléjica familiar (MHF)	Migraña, ataxia paroxística, a veces progresiva	SMEL (Síndrome miástenico Eaton-Lambert)	Debilidad, a veces asociado con ataxia (DCP)
	Ataxia espinocerebelosa tipo 6 (AE6)	Ataxia cerebelosa progresiva	DCP (Degeneración cerebelosa paraneoplásica)	Ataxia cerebelosa progresiva
Canal de potasio Kv 1.1 (AE1)	Ataxia episódica tipo 1 (AE1)	Ataxia paroxística, mioquimias, crisis.	Síndrome Isaac, síndrome Morvan	Neuromiotonía, hiperhidrosis. Síntomas psiquiátricos y crisis
Kv1.2 (autoinmune)			Encefalitis límbica?	

B. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Al inicio del planteamiento de esta tesis en el año 2001, se conocía la existencia de autoanticuerpos contra canales iónicos dependientes de voltaje en síndromes neurológicos periféricos. Dada la asociación entre síndromes que afectan al SNP y síndromes neurológicos centrales, se quiso estudiar si los autoanticuerpos contra canales iónicos dependientes de voltaje presentes en los síndromes neurológicos periféricos, podían estar presentes en síndromes neurológicos centrales. Esto permitiría ayudar a explicar la inmunopatogenia de dichos síndromes, elucidar cómo se comporta el sistema inmune en el SNC y descubrir estrategias para poder manipularlo, facilitando el desarrollo de estrategias de inmunidad terapéutica.

Esto se quiso estudiar en los anticuerpos contra canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) presentes en el síndrome miasténico de Eaton-Lambert (SMEL). Dada la conocida asociación entre el SMEL y la degeneración cerebelosa paraneoplásica subaguda (DCP), quedaba por determinar si la DCP podía estar asociada o no los anticuerpos anti-VGCC. Con esta premisa, se inició el primer trabajo de esta tesis, para poder averiguar, si en la DCP había o no la presencia de anticuerpos anti-VGCC.

En el año 2002, se amplió el estudio de los anticuerpos antineuronales contra canales iónicos en asociación con síndromes neurológicos del SNC, a los canales de potasio dependientes de voltaje (VGKC). Se conocía la presencia de anticuerpos anti-VGKC en la neuromiotonía (afectación del SNP) y también asociados a la presencia de una miastenia gravis con timoma. Al empezar a publicarse en la literatura estudios de casos en los que se asociaban los síntomas de una encefalitis límbica a diferentes neoplasias y en algún caso anticuerpos antineuronales (anti-Hu, anti-Ma, anti-Ri), surgió la posibilidad de

una asociación entre la encefalitis límbica y otros anticuerpos o trastornos. Además, un 40% de los pacientes con encefalitis límbica quedaban por determinar séricamente, por la ausencia de anticuerpos (seronegativos) o la presencia de anticuerpos no caracterizados. Por lo tanto, se planteó el estudio de la presencia de anticuerpos anti-VGKC en pacientes con una encefalitis límbica, de origen paraneoplásico o idiopático.

Este tipo de estudios intentaron confirmar si anticuerpos contra canales de calcio o potasio dependientes de voltaje que, a priori se conocía que afectaban al SNP, podían asociarse a síndromes del SNC. Esto abría las puertas hacia una mejor comprensión de los trastornos autoinmunes adquiridos mediados por canales iónicos en el sistema nervioso central, que pueden ser de origen puramente autoinmune o ser consecuencia de un trastorno inmunitario asociado a la presencia de una neoplasia.

C. OBJETIVOS

1. Evaluar la frecuencia de los anticuerpos contra los canales de calcio tipo P/Q dependientes de voltaje en pacientes con degeneración paraneoplásica cerebelosa y cáncer de pulmón.
2. Realizar una correlación clínico-inmunológica de los pacientes con y sin anticuerpos contra canales de calcio tipo P/Q dependientes de voltaje y un síndrome cerebeloso paraneoplásico asociado a un cáncer de pulmón de célula pequeña.
3. Analizar la presencia de anticuerpos contra los canales de potasio dependientes de voltaje en pacientes con encefalitis límbica.
4. Realizar una correlación clínico-inmunológica entre la presencia de anticuerpos contra los canales de potasio dependientes de voltaje y la encefalitis límbica.
5. Caracterizar un nuevo anticuerpo, observado durante la elaboración del trabajo sobre la encefalitis límbica. Describir las características inmunológicas del anticuerpo, realizando una correlación clínica entre la presencia de dicho anticuerpo y la presencia de un tumor específico y/o presencia de síndrome paraneoplásico.

D. MÉTODOS DE ESTUDIO

Durante el tiempo de estudio se han publicado unos trabajos que se adjuntan (ver Anexos).

I. PACIENTES

En los trabajos 1 y 2 se realizó una selección de pacientes con un diagnóstico de degeneración cerebelosa paraneoplásica o de encefalitis límbica, a partir de la base de datos del Dr. Graus en el Hospital Clínic, Barcelona. Tras la revisión de historias clínicas con el contacto puntual telefónico de aquellos pacientes o médicos que habían diagnosticado al paciente, donde no quedaba claro el diagnóstico realizado, se pudo completar toda la información clínica necesaria para poder asegurarnos de que el diagnóstico clínico (tanto de síndrome miasténico de Eaton-Lambert, como de degeneración cerebelosa o encefalitis límbica) era correcto.

Trabajo 1: Estudio de la incidencia de los canales de calcio tipo P/Q en la degeneración cerebelosa paraneoplásica asociada al cáncer de pulmón

A partir de la base de datos, se seleccionaron 39 pacientes con el diagnóstico final de DCP y cáncer de pulmón (31 pacientes tenían un CPCP, 5 tenían otros tipos de cáncer de pulmón, un paciente presentaba imágenes de radiografía de tórax sugestiva de cáncer de pulmón sin histología confirmativa y dos no tenían evidencia de tumor, aunque eran fumadores y tenían anticuerpos anti-Hu positivos). Estos pacientes presentaban un síndrome cerebeloso aislado o claramente predominante de causa desconocida y tenían anticuerpos anti-Hu o habían desarrollado un cáncer de pulmón. Se excluyeron específicamente los

pacientes con anticuerpos anti-Hu positivos que presentaban ataxia pero que rápidamente presentaban síntomas que no se limitaban al cerebelo, con la idea de no incluir a los pacientes con encefalomielitis paraneoplásica, que en comparación con la DCP, casi siempre cursa con anticuerpos anti-Hu²⁶³. Todos los pacientes fueron estudiados retrospectivamente para la presencia de anticuerpos contra los VGCC, y las características clínicas se compararon entre pacientes con anticuerpos positivos y negativos. El suero y LCR, cuando estaba disponible, se evaluaron para la presencia de anticuerpos antineuronales por inmunohistoquímica en secciones congeladas de cerebelo de rata según las técnicas estandarizadas ya descritas²⁶⁴.

Trabajo 2: Estudio de los anticuerpos contra canales de potasio presentes en pacientes con una encefalitis límbica

Se seleccionaron 15 pacientes entre aquellos cuyo suero había sido enviado para analizar al Dr. Graus para la detección de anticuerpos onconeuronales, y que cumplían los siguientes criterios diagnósticos: inicio subagudo, en días o semanas, de pérdida de memoria de corto plazo, crisis comiciales o cambios en el comportamiento, una RM craneal anormal con lesiones bilaterales, habitualmente asimétricas, sin potenciarse con contraste, hiperintensas en T2 localizadas en el hipocampo, la amígdala, u otras áreas del sistema límbico, excluyéndose otras posibles causas y diagnósticos. La encefalitis límbica se consideró como paraneoplásica si se diagnosticó un tumor en el periodo de seguimiento o si los anticuerpos onconeuronales eran positivos. La encefalitis límbica idiopática, se definió como la ausencia de anticuerpos onconeuronales y la no evidencia de un tumor después de tres años de seguimiento.

Trabajo 3: El uso de un anticuerpo nuclear anti-glial como probable marcador del cáncer de pulmón y como ayuda para el diagnóstico de los síndromes neurológicos paraneoplásicos

Tras haber observado la presencia en algunas secciones de inmunohistoquímica en los trabajos previos, la presencia de una tinción concreta que se repetía frecuentemente en los núcleos de la glia de Bergmann en el cerebelo, un anticuerpo no conocido, se decidió intentar identificar dicho anticuerpo. La glia de Bergmann está compuesta de astrocitos protoplásmicos unipolares en el córtex cerebeloso. Las células de la glia de Bergmann rodean las sinápsis de las células de Purkinje y se extienden de forma radial o rodeando a las dendritas de las células de Purkinje; están asociadas a las células granulares en la glia en desarrollo y a las células de Purkinje en el cerebro adulto. Fueron seleccionadas de los archivos del Dr. Graus de forma retrospectiva, aquellas muestras en las que se había demostrado una inmunoreactividad restringida a los núcleos de la glia de Bergmann²⁶⁵ de la capa de células de Purkinje y de las subpoblaciones de los núcleos celulares de la glia en la sustancia blanca durante la inmunohistoquímica de rutina del cerebelo de rata para detectar anticuerpos onconeuronales, como se ha descrito previamente (ver Figura 10). La reactividad se definió como un anticuerpo nuclear anti-glial (AGNA).

Para definir las asociaciones clínicas con AGNA, se estudió el suero de 113 pacientes sin SPN (síndrome paraneoplásico) y cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP), 122 pacientes con otros tipos de cáncer, y 19 pacientes con un SMEL idiopático, definido por la ausencia de cáncer tras, al menos, 3 años de seguimiento²⁶⁶. Para averiguar la frecuencia de AGNA entre los diferentes SPNs asociados a CPCP, se revisó la presencia de la inmunoreactividad de AGNA en 30 pacientes con un SMEL paraneoplásico, 27 con una degeneración cerebelosa paraneoplásica (DCP), 10 con una neuropatía sensitiva, 10 con un opsoclonus y 8 con una encefalitis límbica. Todos estos pacientes tenían un

CPCP definitivo, exceptuando seis que sólo tenían evidencia radiológica de un cáncer de pulmón. Ninguno de los sueros tenía anti-Hu, anti-Ri, anti-Zic4 u otros anticuerpos asociados que pudiesen oscurecer la presencia de la inmunoreactividad AGNA.

II. MÉTODOS

Trabajo 1: Estudio de la incidencia de los canales de calcio tipo P/Q en la degeneración cerebelosa paraneoplásica asociada al cáncer de pulmón

El síndrome miasténico de Eaton-Lambert es un trastorno en el que la debilidad muscular es debida a una reducción en la cantidad de acetilcolina liberada desde las terminaciones motoras nerviosas. Está asociado a la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) localizados en la membrana de la unión neuromuscular. Aproximadamente un 50 % de los pacientes con SMEL tiene un cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP), y las líneas celulares del CPCP expresan los VGCC. Así pues, el SMEL es un trastorno en el que la respuesta inmunológica da lugar a un síndrome neurológico. La cantidad de anticuerpos contra los VGCC séricos puede medirse por inmunoprecipitación usando un subtipo concreto de toxina (conotoxina MVII C) del *Conus magnus* para marcar el VGCC. Los VGCC se extraen de tejidos humanos o cerebelosos usando digitonina como detergente. La ^{125}I -conotoxina, que está comercialmente disponible, se añade a los anticuerpos séricos que precipitan con un antisuero contra la IgG humana. Un control no radioactivo con conotoxina debería realizarse paralelamente para valorar la precipitación no específica. Determinaciones positivas de >90% no son frecuentes, exceptuando pacientes con una ataxia cerebelosa y un porcentaje bajo de pacientes con CPCP sin una enfermedad neurológica. Las pruebas de laboratorio con conotoxina radioactiva

se realizaron en el laboratorio de la Dra. Vincent de Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Universidad de Oxford. Los anticuerpos contra los VGCC se analizaron utilizando una dilución del suero 1:10, y utilizando 2,5 µL de suero, disminuyendo la dilución en todas aquellas muestras positivas para obtener una determinación más precisa. Las muestras de LCR se evaluaron utilizando 50 µL no diluidos (con 2,5 µL de suero humano normal como un transportador) y se diluyeron cuando fue necesario. Los resultados del LCR se consideraron positivos si eran mayores que la media de ± 3 DS de 14 LCRs de pacientes con ataxias degenerativas. La síntesis intratecal de LCR se calculó en forma de parejas emparejadas de suero y LCR utilizando la fórmula:

$$\frac{\text{Niveles de LCR (pM/mg IgG LCR): Niveles de Suero (pM/mg IgG sérica)}}{\text{IgG total LCR: IgG total sérica}}$$

Se utilizó un valor mayor de 1 como indicativo de síntesis intratecal.

Trabajo 2: Estudio de los anticuerpos contra canales de potasio presentes en pacientes con una encefalitis límbica

Se analizó el suero y LCR (cuando estaba disponible) de los pacientes con clínica de encefalitis límbica, para evaluar la presencia de anticuerpos onconeuronales por técnicas de inmunohistoquímica en secciones congeladas de cerebelo de rata según las técnicas estandarizadas ya descritas.

Se analizaron los anticuerpos contra canales de potasio dependientes de voltaje (VGKC) tal y como se ha descrito previamente usando ^{125}I - α -dendrotoxina-VGKC extraída del córtex del conejo (se han intentado utilizar otras toxinas, sin éxito, porque la dendrotoxina se une solamente a tres

de los ocho isotipos conocidos de VGKC²⁶⁷). Se analizaron las muestras de suero y LCR, de forma ciega a la información clínica, y todas las muestras con resultados positivos se diluyeron para obtener un valor mas ajustado en la determinación.

La detección de anticuerpos se realizó con suero y LCR de pacientes españoles en el laboratorio Weatherall Institute of Molecular Medicine de la Dra. Vincent por la Dra. Pozo-Rosich. Posteriormente, los sueros o muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) se estudiaron para determinar correctamente los niveles de anticuerpos. Los resultados son el valor medio de dos medidas. Se tomó como valor de corte sérico 100pM y 10pM para LCR.

Trabajo 3: El uso de un anticuerpo nuclear anti-glial como probable marcador del cáncer de pulmón y como ayuda para el diagnóstico de los síndromes neurológicos paraneoplásicos.

En este trabajo se intentó definir la presencia de un nuevo anticuerpo, que por su localización se denominó AGNA (anticuerpo nuclear anti-glial) y, que se había observado en tinciones de pacientes con CPCP.

La inmunoreactividad del AGNA se analizó con técnicas de inmunohistoquímica (dilución del suero 1:500; IgG biotinilada del suero AGNA+ a 50 µg/ml) usando una técnica de avidina-biotina en cortes de tejido cerebral de rata prefijado con paraformaldehído, congelados y cortes de tejido cerebral humano prefijados con acetona. Para demostrar si el AGNA de diferentes pacientes reconocía epítomos similares, se pre-incubaron las secciones con suero normal no diluido o suero positivo para AGNA durante 3 horas, seguido de una IgG biotinilada obtenida de un suero positivo para AGNA y desarrollado con una técnica estándar avidina-biotina. Para valorar si existía una inmunoreactividad contra AGNA en las muestras de CPCP, las secciones con parafina, se deparafinaron en xileno,

rehidrataron con alcohol, lavaron con agua del grifo y calentaron durante dos minutos en un horno con un tampón de citrato sódico a 0.1 M (pH 6.0). Tras la inhibición de la peroxidasa endógena con agua oxigenada a 0.3%, las secciones se incubaron secuencialmente con suero humano normal no diluido, AGNA biotinilado o IgG control en un 10% de suero humano normal durante una noche a 4°C y desarrollados con la técnica de la inmunoperoxidasa avidina-biotina.

Para los experimentos de doble marcaje, se incubaron de forma simultánea secciones congeladas de cerebro de rata en una combinación de NeuN (dilución 1:200) monoclonal de ratón (Chemicon, Alemania), que es un marcador específico de núcleos neuronales, y biotinilado con AGNA IgG (1:50) a 4°C durante una noche²⁶⁸. A partir de aquí, las secciones se incubaron con una combinación de anticuerpo anti-ratón caballo conjugado con fluoresceína (1:200) (Vector, Burlingame, CA) y avidina conjugada con istiocianato (1:1000) (Sigma, St Louis, MO) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se obtuvieron secciones ópticas y pares de las mismas generadas digitalmente usando un microscopio confocal con láser Leica TCS 4D.

El análisis Western blot se realizó con proteínas extraídas de homogenizados de tejido nervioso humano (cribaje cerebelo) y cerebelo de rata, y se separaron las líneas celulares HeLa y LAN-1 de neuroblastoma por electroforesis en un gel de poliacrilamida, transferido a papel de nitrocelulosa en el que se practicaron técnicas de Western blot usando las técnicas de avidina-biotina²⁶⁹.

Se realizó un inmunoscreening de una librería Uni-ZAP (Stratagene, La Jolla, CA) de cerebelo humano con un grupo de cinco sueros con AGNA (cada uno diluido 1:1000) tal como se ha descrito previamente²⁷⁰. Se realizaron varios ciclos de screening de anticuerpos para llegar a un 100% de placas positivas. Los clones de fagos se subclonaron usando el protocolo de rescate de fagos in vivo y secuenciados (Stratagene, La Jolla, Ca). Para estudiar si los clones

positivos eran reconocidos por los 5 sueros con AGNA, se prepararon filtros de nitrocelulosa y se mezclaron con las placas de fagos (50% de placas de clones positivos y un 50% de clones irrelevantes). Los filtros se cortaron en tiras y se incubaron con cada uno de los sueros AGNA+ o el suero de control y posteriormente se revelaron con la técnica de inmunoperoxidasa con avidina-biotina (descrita previamente).

Estas técnicas se realizaron en el laboratorio del Dr. Graus en el Hospital Clínic de Barcelona.

E. RESULTADOS / DISCUSIÓN

Trabajo 1: Estudio de la incidencia de los canales de calcio tipo P/Q en la degeneración cerebelosa paraneoplásica asociada al cáncer de pulmón

Se estudiaron 39 pacientes (37 hombres y 2 mujeres) que cumplían los criterios de DCP y que tenían una edad media de 63 años. El cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) se diagnosticó en 31 pacientes y otros tipos de cánceres de pulmón en otros 5 pacientes. Un paciente tenía características radiológicas de cáncer de pulmón, pero no se pudo obtener ninguna histología. Dos pacientes que no tenían evidencia de un tumor se incluyeron porque eran fumadores y tenían anticuerpos anti-Hu.

De estos pacientes seleccionados, solo ocho (20,5%) de los pacientes tenían características clínicas consistentes con un SMEL (ver Tabla 16). Un paciente que no tenía anticuerpos contra los VGCC en el momento del diagnóstico de la ataxia, dos años después desarrolló características electromiográficas de SMEL (no estaba el suero disponible en este momento). En los otros siete pacientes, el SMEL estaba presente en el momento de la evaluación neurológica inicial. Se practicó también un electromiograma (EMG) en los nueve pacientes con anticuerpos positivos VGCC que no tenían evidencia clínica de SMEL y fue negativo en todos ellos. El EMG se realizó específicamente para descartar un SMEL en cinco de los nueve pacientes. En los otros cuatro, el EMG con estimulación repetitiva no se realizó, pero el potencial de acción compuesto se describió como normal.

Tabla 16. Asociación entre las características clínicas y la presencia de anticuerpos anti-VGCC en los 39 pacientes con DCP

Características clínicas	Anti VGCC positivo+ (n=16)	Anti VGCC negativo - (n=16)	p
Sexo			
Masculino	20	17	NS
Femenino	0	2	
Edad	63	63	NS
Anticuerpos Hu			
Positivo (+)	2	7	NS
Negativo (-)	14	16	
Evidencia Clínica de SMEL			
Si	7	1*	0.044
No	9	22	
Rankin en el diagnóstico			
1-3	7	9	NS
4-6	8	13	
Desconocido	1	1	
Tiempo medio desde síntomas DCP hasta diagnóstico (meses)	3	3	NS
Tipo Tumor			
CPCP**	13	18	NS
No – CPCP**	2	3	
Evidencia radiológica**	1	0	
Sin cáncer**	0	2	
Tipo tratamiento de la DCP			
Oncológico ± inmunoterapia	9	9	NS
Inmunoterapia	4	2	
Ninguno	3	11	
Desconocido	0	1	
Respuesta al tratamiento de la DCP			
Mejoría (de ≥1 punto escala Rankin)	1	3**	NS
Estable (Rankin ≤3, 6 meses seguimiento)	5	3	
Otra (empeoramiento o estable Rankin >3)	5	3	
Desconocido / No aplicable	5	14	
Media supervivencia (meses)	12	10	NS

*Suero evaluado cuando el paciente no tenía evidencia clínica de SMEL.

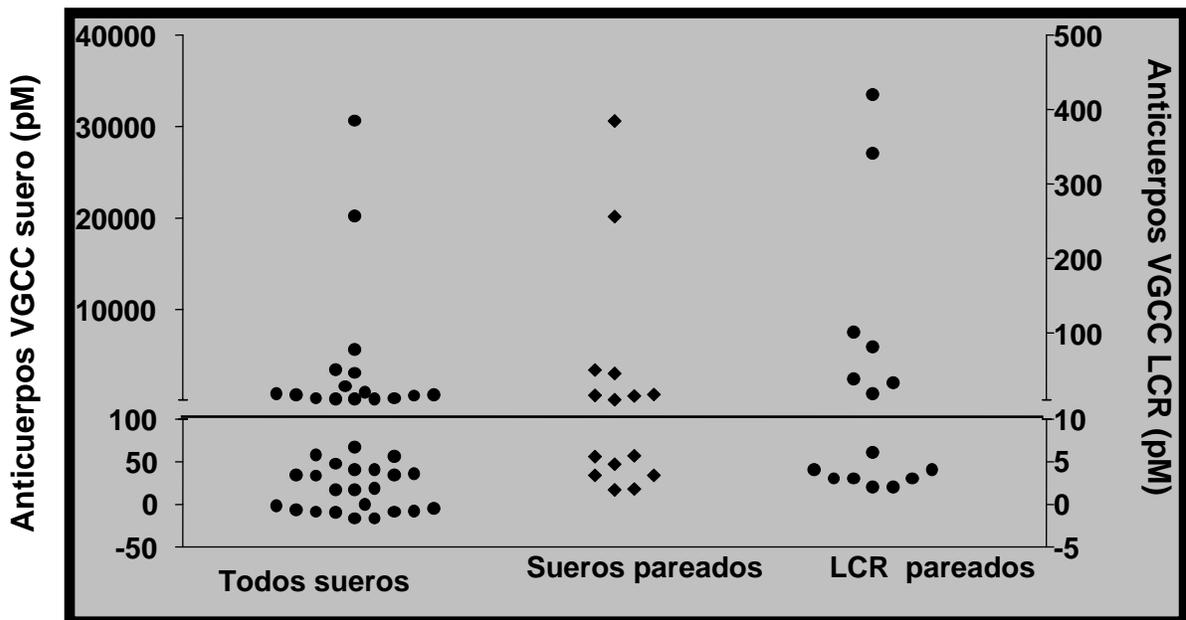
**Dos de los tres pacientes eran anti-Hu positivos

VGCC = canales de calcio dependientes de voltaje; DCP = degeneración cerebelosa paraneoplásica; SMEL = síndrome miasténico de Eaton-Lambert; CPCP = cáncer de pulmón de célula pequeña.

Se identificaron anticuerpos contra VGCC en 16 (41%) de los pacientes (media de los títulos positivos 648 pM/L; ver Figura 9). No se observaron diferencias mayores entre pacientes con y sin anticuerpos contra-VGCC excepto una mayor incidencia de SMEL en el grupo positivo (ver Tabla 16). En tres de los pacientes con DCP y SMEL a los que se les administró inmunoterapia, hubo una mejoría en el SMEL sin cambios en la clínica de la DCP. Se consiguieron en 15 pacientes muestras pareadas de suero y LCR.

Se encontraron anticuerpos positivos VGCC en el LCR de 7 pacientes (47%), con un título medio de 81 pM/L (ver Figura 9). Los índices de medida de la IgG del anticuerpo VGCC en LCR: suero se pudieron realizar en 7 pacientes, de los cuales; cuatro tenían valores >1 (rango entre 1,5 y 4,8) compatibles con síntesis intratecal del anticuerpo.

Figura 9. Niveles de anticuerpos contra canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) en pacientes con degeneración cerebelosa paraneoplásica y cáncer de pulmón



Los valores del suero se refieren al eje vertical izquierdo y los valores de LCR se refieren al eje vertical derecho. La línea horizontal diferencia en su parte superior las muestras que han sido positivas para anticuerpos anti-VGCC del resto de muestras de pacientes que no son positivas, en la zona inferior.

Este trabajo, se inició para evaluar la importancia de los anticuerpos contra canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) tipo P/Q en un grupo de pacientes con degeneración cerebelosa paraneoplásica (DCP) y cáncer de pulmón, intentando:

- comparar la presencia clínica o electrofisiológica de síndrome de Eaton-Lambert (SMEL),
- conocer las diferencias en el pronóstico clínico de pacientes con o sin anticuerpos contra VGCC, y
- evaluar la posibilidad de una síntesis intratecal de anticuerpos contra VGCC.

El estudio de estos anticuerpos contra VGCC se realizó tras la evidencia de que en casos con DCP y cáncer de pulmón no siempre se detectan los anticuerpos antineuronales tipo Hu, u otros. Periféricamente, los anticuerpos contra VGCC se encuentran en el SMEL, aunque si pudiesen acceder al SNC podrían estar implicados en la fisiopatogenia de la DCP.

Tras evaluar los 39 pacientes con DCP y cáncer de pulmón estudiando la presencia de anticuerpos contra VGCC se pudo concluir que:

- los anticuerpos contra VGCC son un marcador importante para la DCP asociada a cáncer de pulmón, dado que los anticuerpos contra VGCC estaban presentes en un 41% de pacientes, en una proporción mayor que los anticuerpos Hu.
- Los anticuerpos contra VGCC podrían tener un papel importante en el desarrollo de una DCP, dado que en un 47% de pacientes había evidencia de una síntesis intratecal de anticuerpos contra VGCC.
- Se debería buscar la presencia de anticuerpos contra VGCC en pacientes con sospecha de DCP, aún y cuando no tengan un SMEL.

Trabajo 2: Estudio de los anticuerpos contra canales de potasio presentes en pacientes con una encefalitis límbica

Este trabajo fue pensado para comparar los casos de encefalitis límbica en los que se conocía la presencia de una neoplasia, a la que se le atribuía ser la causante de la encefalitis y aquellos casos en los que no se diagnosticaba un cáncer, incluso tras muchos años de seguimiento. Hasta un 50% de los pacientes con encefalitis límbica y cáncer de pulmón de célula pequeña tienen anticuerpos anti-Hu. El resto de pacientes, aquellos sin anticuerpos anti-Hu, no desarrollan síntomas fuera del sistema límbico y mejoran con tratamiento contra el cáncer.

Apoyándonos además, en un par de publicaciones recientes en las que se describió la presencia de anticuerpos contra canales de potasio dependientes de voltaje (VGKC), en los que los pacientes mejoraban tras la reducción en los niveles de anticuerpos; se estudió la presencia en suero y líquido cefalorraquídeo de anticuerpos contra VGKC.

Con esto los objetivos eran establecer si la presencia de anticuerpos contra VGKC estaba asociada a:

- características clínicas determinadas,
- una respuesta concreta al tratamiento con inmunosupresores.

Esto se analizó en 15 pacientes que se identificaron con síntomas y signos clínicos compatibles con una encefalitis límbica: pérdida de memoria reciente y otros síntomas cognitivos y psiquiátricos. Nueve pacientes presentaron también crisis comiciales, y éstas fueron el único síntoma de presentación en un paciente (paciente 13, ver Tabla 17), que se había descrito previamente²⁷¹. En uno de los pacientes anti-Ma2 positivo (paciente 14, ver Tabla 17) los síntomas clínicos predominantes reflejaban la afectación de la parte superior del tronco del encéfalo y el diencefalo²⁷².

Se detectaron anticuerpos contra VGKC en cuatro pacientes. Dos de estos pacientes tenían una encefalitis límbica idiopática sin un tumor diagnosticado tras 5 y 3 años de seguimiento, mostrando dichos pacientes los niveles más elevados de anticuerpos anti-VGKC (992 y 810 pM) con niveles de AC en LCR de 69 y 52 pM, respectivamente. Tras tres ciclos mensuales de inmunoglobulinas endovenosas (0,4mg/día x 5 días) y metilprednisolona (1g/día x 3 días), ambos pacientes presentaron una resolución clínica y de las imágenes de RM craneal de la encefalitis límbica. Iniciada la mejoría, recibieron 5 ciclos bimensuales de inmunoglobulinas endovenosas a un 50% de la dosis inicial. Al final de estos tratamientos, los estudios neuropsicológicos mostraron una pérdida de memoria de corto plazo leve que no interfería con la vida normal. Los pacientes no recayeron en la sintomatología de la encefalitis límbica y las determinaciones séricas del anticuerpo anti-VGKC fueron negativas en el primer paciente y de 474 pM en el segundo paciente. No se obtuvieron muestras de LCR de seguimiento para analizar.

Los otros dos pacientes con anticuerpos anti-VGKC positivos tenían una encefalitis límbica paraneoplásica sin antígenos onconeuronales. Los niveles de anticuerpos anti-VGKC eran de 170 y 300 pM, respectivamente (no estaba disponible en estos pacientes una muestra de LCR). El primer paciente tenía un cáncer de pulmón de célula pequeña que no respondió a quimioterapia, con una respuesta parcial de la encefalitis límbica tras un ciclo único de inmunoglobulinas endovenosas y esteroides, pero 6 meses más tarde tuvo una recaída de la encefalitis límbica con aumento de las lesiones en RM craneal, a la vez que una progresión del tumor. El paciente experimentó una recuperación espectacular tras pulsos de tratamiento con metilprednisolona (1g/día x 5 días) que continuaba recibiendo. Los anticuerpos contra los VGKC fueron positivos en la segunda recaída (118 pM), pero no se consiguieron muestras en el momento de la remisión. El segundo paciente tenía una encefalitis límbica probablemente

paraneoplásica, puesto que en estudios con PET (tomografía por emisión de positrones) mostraba un aumento de la captación del trazador en el mediastino, aunque no se llegó a confirmar la histología. Se le administró un tratamiento con inmunoglobulinas endovenosas y esteroides sin éxito, continuando el paciente con importantes déficits de memoria y niveles elevados de anticuerpos anti-VGKC (539 pM) incluso 22 meses después. La progresión del tumor no se llegó a confirmar.

Tabla 17. Características clínicas e inmunológicas de 15 pacientes con encefalitis límbica

Paciente	Edad/sexo	Diagnóstico	Cáncer	Anticuerpo	Tratamiento	Respuesta	Supervivencia (meses)
1	50/M	Idiopática	No	VGKC (810 pM)	IVIG+esteroides	Remisión completa	+60
2	65/M	Idiopática	No	VGKC (992 pM)	IVIG+esteroides	Remisión completa	+36
3	47/M	Paraneoplásica	CPCP	VGKC (170 pM)	IVIG+esteroides ^a	Remitente-recurrente	+10
4	67/M	Paraneoplásica*	Pulmón**	VGKC (300pM)	IVIG+esteroides	No mejoría	+22
5	69/M	Paraneoplásica	CPCP	Ninguno	Ninguno	No evaluable	3
6	61/M	Paraneoplásica	CPCP	Ninguno	Ninguno	No mejoría	9
7	65/M	Paraneoplásica *	Pulmón***	Ninguno	IVIG	No mejoría	+15
8	74/M	Paraneoplásica	Ninguno	Hu	Ninguno	Falta seguimiento	10
9	66/M	Paraneoplásica	CPCP	Hu	Ninguno	No mejoría	5
10	50/M	Paraneoplásica	CPCP	Hu	Esteroides+ ciclofosfamida	No mejoría	9
11	50/M	Paraneoplásica	CPCP	Hu	Ninguno	Progresión a EMP	4
12	49/M	Paraneoplásica	Prostata	Hu	Ninguno	Progresión a EMP	2
13	60/M	Paraneoplásica	CPCP	Hu	Quimioterapia	EL estable	31
14	26/M	Paraneoplásica	Seminoma	Ma2	Quimioterapia + IVIG	Remisión completa	+36
15	27/M	Paraneoplásica	Seminoma	Ma2	IVIG+esteroides	Remisión parcial	+15

*Probablemente paraneoplásica. ** Sólo evidencia con PET, *** Tumor no-CPCP diagnosticado 5 años antes de la EL.

^a Sólo esteroides en la segunda recaída.

CPCP: cáncer de pulmón de célula pequeña; VGKC: canal de potasio dependiente de voltaje; IVIG: inmunoglobulina endovenosa; EMP: encefalomielitis paraneoplásica; EL: encefalitis límbica.

Los otros 11 pacientes, que no tenían niveles detectables de anticuerpos anti-VGKC, tenían una encefalitis límbica paraneoplásica definida por la presencia de anticuerpos anti-Hu y cáncer en 5 pacientes, anticuerpos anti-Hu sin cáncer en un paciente, y anticuerpos anti-Ma2 y cáncer testicular en otros dos pacientes. Tres pacientes tenían un cáncer de pulmón sin anticuerpos onconeuronales. No se observó una mejoría clínica en aquellos pacientes con encefalitis límbica sin anticuerpos anti-VGKC excepto en dos pacientes con anticuerpos anti-Ma2 que respondieron al tratamiento con inmunoglobulina endovenosa, como se ha descrito previamente. En ambos pacientes, los niveles de anti-Ma2 se mantuvieron elevados a pesar de la mejoría clínica.

Las conclusiones del estudio fueron que la presencia de anticuerpos contra VGKC:

- no podía predecir la presencia de una neoplasia,
- mejoraba la respuesta al tratamiento inmunosupresor, y
- daba lugar a una encefalitis límbica potencialmente reversible y con mejor pronóstico.

Trabajo 3: El uso de un anticuerpo nuclear anti-glial como probable marcador del cáncer de pulmón y como ayuda para el diagnóstico de los síndromes neurológicos paraneoplásicos

Este trabajo, se inició tras observar durante el estudio de los anticuerpos contra VGKC la presencia de unos anticuerpos nucleares anti-gliales (AGNA). Tras una estancia en el Weatherall Institute of Molecular Medicine de la Universidad de Oxford, le comenté esta apreciación al Dr. Graus. Él a su vez, ya había observado dicho fenómeno en múltiples ocasiones, especialmente en aquellos pacientes con una neoplasia de pulmón y sin otros anticuerpos evidentes. Por este motivo se planteó:

- caracterizar de forma inmunológica este anticuerpo nuclear anti-glial, y
- correlacionar su presencia a una sintomatología clínica (síndrome paraneoplásico) o a la presencia de un tipo de tumor.

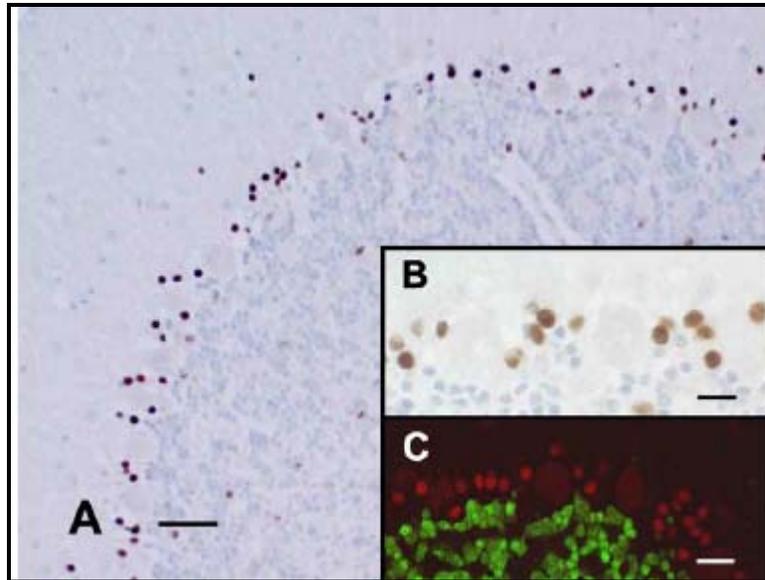
Se caracterizó el anticuerpo nuclear antiglial mediante inmunohistoquímica, inmunoblots; y se utilizó una IgG biotinilada de AGNA para analizar la inmunoreactividad del tumor y realizar un análisis de epítomos.

Se analizó la reactividad contra AGNA en pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña, pacientes con otros tipos de neoplasias, pacientes con esclerosis múltiple y pacientes control.

Por definición, el AGNA se caracterizó por la reducida, y fácilmente reconocible, restricción de la reactividad a los núcleos de la glía de Bergmann del cerebelo de rata (ver Figura 10). En otras células del cerebelo no se observó esta reactividad exceptuando núcleos celulares gliales aislados en la sustancia blanca. Los experimentos con doble marcaje confirmaron que los núcleos teñidos alrededor de las células de Purkinje eran aquellos de la glía (no de neuronas de la capa de células granulares). El patrón de unión del anticuerpo en el cerebelo de rata se

abolió mediante la preincubación con 16 (76,2%) de los 21 sueros utilizados usando experimentos de inhibición competitiva. La inmunoreactividad del AGNA también se reprodujo en el cerebelo de ratón y humano.

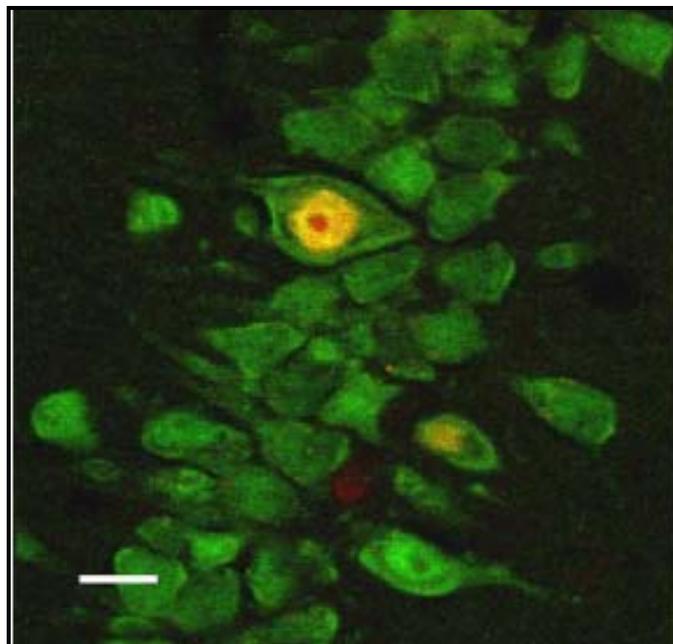
Figura 10. Núcleos de la glia de Bergmann en la capa de células de Purkinje



(A) Secciones congeladas de cerebelo de rata fijado con paraformaldehído que ha inmunoreaccionado con suero AGNA+. Se aprecia un marcaje intenso de los núcleos de la glia de Bergmann en la capa de células de Purkinje. (B) Imagen de la misma sección a mayor aumento. (C) Estudio con doble marcaje mostrando que el AGNA reacciona con los núcleos de la glia de Bergmann (rojo), que no están marcados con anticuerpo monoclonal NeuN que es específico para núcleos neuronales (verde). El NeuN marca los núcleos de las células granulares y otras neuronas cerebelosas excepto las células de Purkinje268. Bar=38 μ m (A), 18 μ m (B) y 24 μ m (C). Las secciones (A) y (B) están contrateñidas con hematoxilina-eosina.

Además de la inmunoreactividad en el cerebelo, el AGNA se encontró que teñía núcleos gliales por todo el cerebro, células endimarias y células satélites de los ganglios del asta dorsal. No ocurrió esto en el plexo coroideo, las células endoteliales y las meninges. Los núcleos aislados positivos para AGNA, definidos por el tamaño nuclear y la forma de la célula y reacción inmune al anticuerpo NeuN, se observaron en el córtex, hipocampo, ganglios basales, hipotálamo y tronco del encéfalo superior.

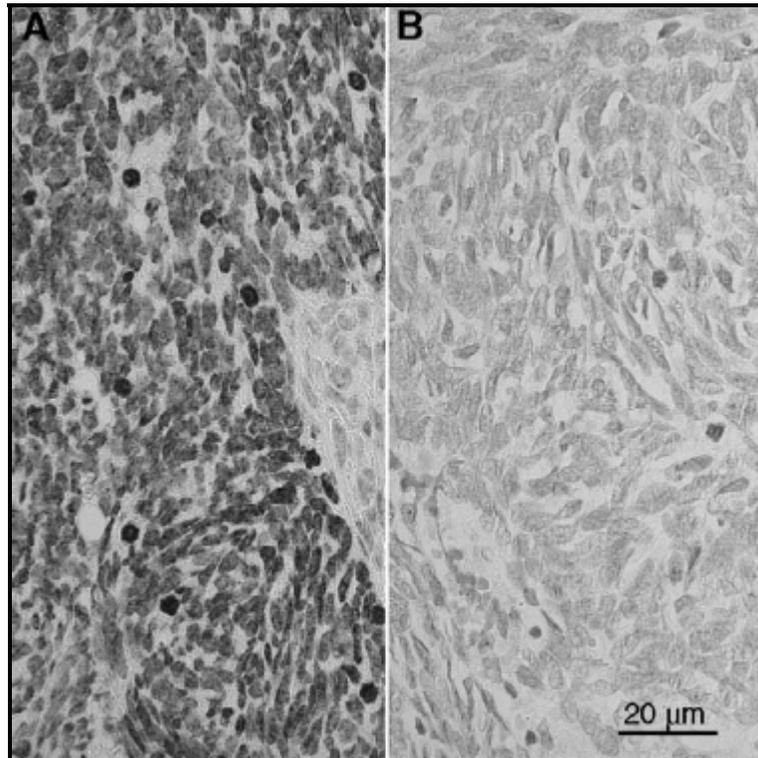
Figura 11. Sección congelada de hipocampo de rata fijada con paraformaldehído, con doble marcaje: IgG AGNA biotinilado (rojo) y anticuerpo NeuN (verde)



El núcleo de una neurona coexpresa con ambos antígenos (amarillo) mientras que el nucléolo sólo está marcado con AGNA. Bar=11 μ m.

En algunos grupos neuronales en el lóbulo frontal y en el diencéfalo, todos los núcleos eran AGNA positivos. A diferencia del cerebro adulto de la rata, AGNA marcó la mayoría de núcleos neuronales en el cerebro de ratas postnatales precoces (P1 a P3). Los tejidos sistémicos de la rata (timo, pulmón, corazón, estómago, colon, hígado, bazo, riñón y testículos) fueron negativos para AGNA IgG biotinilada. El suero de un paciente, con CPCP sin un SPN, incubado con este anticuerpo, mostró una fuerte inmunoreactividad que se abolió con una preincubación con suero positivo de AGNA (ver Figura 12).

Figura 12. Secciones con parafina de cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) que han inmunorreaccionado con IgG AGNA biotinilado



La importante reactividad de la IgG AGNA biotinilada (A) es abolida mediante la preincubación con suero positivo para AGNA (B). Las secciones están contrateñidas con hematoxilina.

El análisis del antígeno se realizó con inmunoblots de diferentes homogenados de tejidos con varios sueros positivos AGNA. Esto fracasó en producir una banda común para identificar el AGNA de forma más precisa. El screening de la librería cerebelosa produjo 13 clones reactivos que codificaban 8 proteínas. Sólo dos de ellos eran específicos para el cerebro y se localizaban en el núcleo celular y ninguno fue reconocido por más de un suero con AGNA.

El anticuerpo AGNA fue identificado en 24 pacientes, 19 tenían un CPCP, tres de ellos tenían evidencia radiológica de un cáncer de pulmón, y dos no tenían cáncer, pero uno de ellos tenía un SMEL diagnosticado durante el seguimiento durante el primer año. Por lo tanto, la detección de este anticuerpo fue altamente predictiva de tener un CPCP. Nueve pacientes tenían un SMEL, cinco una DCP, uno de ellos además con un SMEL, tres una neuropatía sensitiva, dos una encefalitis límbica, y uno una neuropatía sensitivomotora. Cuatro pacientes no tenían un SPN, dos tenían un CPCP y uno de ellos una evidencia radiológica de cáncer de pulmón. Los diagnósticos finales neurológicos eran neuropatía sensitiva relacionada con quimioterapia, neuropatía diabética, y una encefalopatía no definida en un paciente con un CPCP progresivo y metastásico. El cuarto paciente tenía una demencia lentamente progresiva y artritis reumatoide sin evidencia de cáncer tras 3 años de seguimiento.

Para analizar la síntesis intratecal, se incubaron secciones cerebelosas de rata con cantidades similares de IgG de LCR que estaban pareados con sueros de 5 pacientes AGNA+ en suero (DCP: 2, SMEL: 2, no SPN: 1). En cuatro pacientes, la reactividad AGNA se perdió en el LCR a concentraciones de IgG mayores que las encontradas en un suero pareado. En el quinto paciente, la reactividad AGNA se perdió a concentraciones de IgG que eran la mitad de la concentración del suero pareado. Estos experimentos sugirieron que la síntesis intratecal de AGNA no era una característica común de la población estudiada.

Debido a la asociación con el CPCP, se analizó la presencia de AGNA en el suero de 113 pacientes sin enfermedad neurológica y CPCP, y en 122 de otros tipos de cáncer. El AGNA sólo se detectó en 13 (11,5%) de los pacientes, todos ellos tenían un CPCP ($p < 0.0001$). Para estudiar si la frecuencia del AGNA en los pacientes con CPCP con un SPN era más alta que aquella observada en los pacientes con CPCP sin trastornos neurológicos, se revisó la frecuencia del AGNA en los pacientes con SPN y CPCP. El análisis se restringió a aquellos

pacientes que no tenían ningún anticuerpo onconeuronal, puesto que su presencia enmascara la inmunoreactividad AGNA. Los resultados se resumen en la *Tabla 18*. En comparación con la frecuencia de AGNA en los pacientes con un CPCP aislado, 23 (27%) de los 85 pacientes que tenían un CPCP asociado a una variedad de SPNs tenían AGNA+ ($p=0.009$). Sin embargo, la mayor frecuencia del AGNA en los SPN fue en su mayor parte, debida a la frecuencia relativa de la presencia de SMEL, mientras que otros pacientes con SPN mostraron una frecuencia de AGNA que no era diferente de aquella en pacientes con un CPCP aislado. Es interesante, como los pacientes con DCP y AGNA tenían también anticuerpos contra canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC).

Tabla 18. Frecuencia de AGNA en los pacientes con síndromes neurológicos paraneoplásicos (SPN) y un cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) sin anticuerpos anti-Hu, Ri, o Zic4

Síndrome	Número pacientes con SPN	AGNA (%)	Valor p ^a
Síndrome Miasténico de Eaton-Lambert ^o	30	13 (43.3)	0.0002
Degeneración cerebelosa	27	5 (18.5)	0.34
Neuropatía sensitiva	10	3 (30.0)	0.12
Opsoclonus	10	0 (0.0)	0.60
Encefalitis límbica	8	2 (25.0)	0.26
SPN Total	85	23 (27.1)	0.009
No SPN	113	13 (11.5)	

^a Todos los síndromes comparados con la serie de CPCP sin enfermedad neurológica por la prueba exacta Fisher.

^o Pacientes con SMEL paraneoplásico que se recogieron en tres laboratorios (Dr. Graus, Dra. Vincent, Dr. Dalmau); todo el resto de pacientes son de la base de datos del Dr. Graus. El análisis es estadísticamente significativo ($p=0.01$) si sólo se analizan los 23 pacientes con SMEL paraneoplásico (ocho de 23 pacientes—35%— eran AGNA+) del laboratorio del Dr. Graus.

Para determinar si el AGNA estaba ligado al SMEL, se analizó la presencia de AGNA en 49 pacientes con SMEL con o sin CPCP. Trece de los 30 (43%) pacientes con SMEL y un CPCP dieron positivo para AGNA, mientras que ninguno de los 19 pacientes con SMEL sin cáncer tenían AGNA ($p=0.0006$).

Así que, los resultados mostraron que sólo existía una reactividad contra AGNA en aquellos sueros de pacientes con un CPCP. Aunque no se pudo encontrar mediante técnicas de inmunoblot una banda específica.

Por lo tanto, concluimos que:

- la frecuencia de AGNA no es mayor que la esperada en la presencia de síndrome paraneoplásico asociado a cáncer, excepto en el SMEL;
- la inmunidad contra el antígeno del AGNA es probablemente irrelevante en la patogenia de los síndromes paraneoplásicos;
- el AGNA es un buen marcador para sugerir la presencia de un tumor de pulmón de célula pequeña subyacente.

F. DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis apoya la introducción del concepto de la existencia de canalopatías autoinmunes del SNC.

El mejor conocimiento de las patologías de los canales iónicos dependientes de voltaje que afectan al sistema nervioso central y su posible etiología autoinmune es importante por varios motivos: (1) nos permite conocer mejor la regulación y funcionamiento de dichos canales en el SNC, (2) ayuda a comprender mejor los mecanismos inmunitarios que están presentes en el SNC y, (3) facilita la iniciación de abordajes terapéuticos más orientados a la fisiopatología con el objetivo de aliviar síntomas y quizá curar la enfermedad.

La degeneración cerebelosa subaguda asociada a un CPCP es un síndrome candidato a ser una canalopatía autoinmune del SNC. La evidencia para plantearse esta hipótesis surgió de la asociación descrita entre el síndrome de Eaton-Lambert y la DCP y la relación entre el SMEL y los anticuerpos anti-canales de calcio dependientes de voltaje. Para analizar esta hipótesis, evaluamos la frecuencia de los anticuerpos anti-VGCC tipo P/Q en pacientes con una DCP. Averiguamos que un 41% de pacientes con una DCP tenían anticuerpos anti-VGCC. Observamos cómo los anticuerpos anti-VGCC estaban presentes tanto en casos de un SMEL clínico como en casos subclínicos, diagnosticados con electromiografía. El SMEL no es lo que determina la presencia de anticuerpos anti-VGCC, con lo que a pesar de que la hipótesis inicial surgiese de la conocida asociación entre el SMEL y los anticuerpos anti-VGCC, luego se pudo demostrar que el SMEL no estaba siempre presente en estos pacientes con DCP y anticuerpos anti-VGCC. Dada la presencia de anticuerpos anti-VGCC en sólo un 41% de los pacientes con DCP, según lo

demostrado en nuestro estudio, es posible que otros anticuerpos (tipo anti-VGCC o no) puedan estar implicados en la génesis del síndrome.

Con el objetivo de estudiar la función de los anticuerpos anti-VGCC en los diferentes tipos de VGCC en el SMEL, se ha estudiado la acción de la IgG asociada al SMEL en VGCC humanos clonados transfectados a células embrionarias humanas de riñón (HEK293)²⁷³. Con esto, se ha demostrado que las IgG-SMEL se unen mayoritariamente a los VGCC tipo P/Q reduciendo la corriente de calcio en estas células. En un porcentaje menor, se unen a los VGCC tipo N, sin ser capaces de reducir completamente la corriente de calcio. Además, se ha estudiado si la acción de las IgG-SMEL sobre los VGCC es diferente según el tipo de tejido. Primero en el SNC, donde provocaron una reducción de los VGCC tipo P/Q en neuronas de cerebelo de rata, asociado a un aumento de los canales VGCC tipo R. Luego, en el SNP, donde también provocaron una reducción de los canales tipo P/Q, seguido de un aumento de los canales VGCC tipo L y R. Estos hallazgos permiten comprobar como a nivel funcional, la plasticidad de la expresión de los VGCC contrarresta las alteraciones producidas por las IgG-SMEL, reduciendo los efectos patogénicos. Esto fue ampliado con otro estudio que demostró como las IgG-SMEL se podían también unir al subtipo de VGCC tipo N, sin reducir la expresión global de los canales VGCC²⁷⁴.

Ahora bien, nos tenemos que preguntar si en la DCP asociada a un CPCP, los anticuerpos anti-VGCC son patogénicos o sencillamente marcadores de lesión neuronal. Esto es porque con tratamientos inmunomoduladores los pacientes presentan una disminución de los títulos de anticuerpos pero no siempre mejoran clínicamente. Se han observado diferencias evidentes entre los pacientes con SMEL y aquellos con una DCP. Los pacientes con un SMEL responden bien a la inmunoterapia. En cambio, los pacientes con una DCP no. Queda por determinar si la presencia de anticuerpos anti-VGCC en la DCP

asociada a un CPCP es un signo de daño neuronal irreversible o de muerte celular por un mecanismo citotóxico en las células de Purkinje o, si es un marcador de la ineficacia de los tratamientos inmunosupresores para eliminar dichos anticuerpos del LCR, dificultando la mejoría clínica del paciente. Además, en la DCP, la supervivencia no mejora si el paciente tiene otro anticuerpo onconeuronal (anticuerpo anti-Hu u otros)²⁷⁵; sin embargo, si el paciente presenta además de una DCP con anticuerpos anti-VGCC, un SMEL clínico, sí que mejora la supervivencia²⁷⁶. Esto podría explicarse si la respuesta inmunitaria que provoca síntomas periféricos activase diferentes mecanismos del sistema inmune que ayudasen a luchar contra el cáncer. En este caso, los anticuerpos anti-VGCC serían un marcador secundario.

Entre los síndromes paraneoplásicos, la etiología autoinmune se ha demostrado en el SMEL, donde los anticuerpos anti-VGCC son patogénicos, dado que disminuyen los VGCC tipo P/Q en la terminación nerviosa presináptica^{277, 278}. En la DCP, a pesar de la hipótesis de una síntesis intratecal, que apoyaría la función patogénica de los anticuerpos, la única evidencia, que no ha sido posteriormente corroborada, es la que demuestra un estudio con autopsias de tres pacientes con DCP y SMEL. En estos pacientes, el índice de complejos auto-anticuerpo VGCC en relación a los canales VGCC tipo P/Q estaba aumentado respecto al control. En el cerebelo de estos pacientes con DCP-SMEL, los lugares de unión de la toxina a los VGCC tipo P/Q estaban francamente reducidos, especialmente en la capa molecular que es donde habitualmente hay más presencia de dichos canales VGCC tipo P/Q. Dicho estudio sugiere que la capa molecular del cerebelo es la diana inmunológica para el desarrollo de la DCP y el SMEL. Otros estudios, no han podido demostrar, in vivo, una respuesta inmune celular con degeneración cerebelosa, a un antígeno de la célula de Purkinje²⁷⁹.

En los pacientes con una DCP, con o sin presencia clínica o subclínica de SMEL, se debe estudiar la presencia de anticuerpos anti-VGCC porque son el

marcador más importante de un CPCP asociado a una DCP. Sorprende sin embargo, la ausencia de SMEL en algunos pacientes con DCP con títulos elevados de anticuerpos anti-VGCC. Esta ausencia de SMEL puede que se deba a la especificidad de los anticuerpos que sólo afectan al SNP o puede que la terminación nerviosa motora regule al alza otros tipos de VGCC para superar la disfunción periférica.

La encefalitis límbica es otro síndrome candidato a ser una canalopatía autoinmune del SNC. Históricamente fue descrita por Corsellis y colaboradores en 1968²⁸⁰, en 3 pacientes que presentaron un cuadro subagudo de semanas de duración con confusión mental y crisis epilépticas, a los que se les diagnosticó un CPCP en el mediastino. La causa exacta de la relación entre el cuadro neurológico y el cáncer pudo explicarse posteriormente tras la identificaron en suero de un anticuerpo (anti-Hu) en pacientes afectos con una encefalomiелitis paraneoplásica^{281,282}. Esto abrió la posibilidad a la existencia de síndromes neurológicos que tenían una etiología inmune mediada por un tumor.

Sin embargo, actualmente hay evidencias que permiten plantear la hipótesis de que la EL sea una canalopatía autoinmune. Por un lado, la conocida existencia de EL idiopáticas donde los pacientes tras años de seguimiento no desarrollan una neoplasia; y por otro lado, la presencia de anticuerpos anti-VGKC en enfermedades autoinmunes, tanto del SNP (neuromiotonía) como del SNC (síndrome de Morvan), que cursan con síntomas centrales similares a los de una EL (crisis epilépticas, psicosis).

Los anticuerpos anti-VGKC (de la familia del canal Kv1) son detectables en sueros de pacientes con neuromiotonia, en aproximadamente un 50% utilizando la ¹²⁵I- α -dendrotoxina que reconoce especialmente los canales Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6 y en >85% utilizando ensayos moleculares e inmunohistoquímicos (se

utilizan genes conocidos de proteínas diana para detectar auto-anticuerpos específicos en pacientes con neuromiotonía).

El estudio desarrollado a lo largo de este trabajo, demuestra que la EL puede asociarse a anticuerpos anti-VGKC. Los anticuerpos anti-VGKC son relativamente frecuentes en la EL, y en caso de tratarse de una EL paraneoplásica éstos no se acompañan de otros anticuerpos onconeuronales. Los títulos de anticuerpos varían según la etiología de la encefalitis, siendo más elevados en la EL idiopática y menos en aquellas de origen paraneoplásico conocido. Queda por determinar el porqué de esta diferencia en el nivel de los títulos de anticuerpos. Sabemos que en la EL paraneoplásica, el anticuerpo suele ser un marcador tumoral, no patogénico, que no se modifica con la inmunoterapia y donde los antígenos diana son intracelulares. Por este motivo, se cree que la inmunidad implicada es celular tipo T. La respuesta antitumoral tipo T puede que se active por células dendríticas que han internalizado células tumorales apoptóticas (presentación cruzada). Como los linfocitos T citotóxicos eliminan las dianas induciendo una muerte celular por apoptosis, este mecanismo tiene el potencial de crear un círculo de retroalimentación positiva que permite la amplificación de la respuesta inmune. En estos casos, el tratamiento más eficaz no es inmunológico sino que es realizar un tratamiento del cáncer. Mientras que, en la EL idiopática de probable origen autoinmune, el título de anticuerpos suele ser más elevado, variando en relación directa con la clínica y la respuesta al tratamiento inmunosupresor, actuando de marcador de mejoría o empeoramiento clínico-inmunológico.

En los trastornos autoinmunes, los anticuerpos son patogénicos y median las respuestas inmunes contra proteínas extracelulares, son estas proteínas de membrana que actúan de antígenos. Aunque no hay evidencia comprobada, la rápida modulación de los títulos de anticuerpos al tratamiento inmunosupresor, puede indicar que se trate de un trastorno monofásico (post-infeccioso) que

permita una mayor permeabilidad de la BHE en zonas más susceptibles como el hipocampo. Aunque hay un grupo de pacientes que mejoran rápidamente con tratamiento pero sufren recaídas periódicas. Así pues, la presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-VGKC puede predecir la existencia de un síndrome que responde bien a tratamientos con inmunoterapia, indicando indirectamente que los anticuerpos puedan ser patogénicos y reflejando que la respuesta inmune no ha provocado una lesión neuronal irreversible.

La presencia de títulos elevados de anticuerpos que se encuentra en pacientes con una EL, en comparación con aquellos con una neuromiotonía, puede justificar el paso de estos anticuerpos por la barrera hematoencefálica llegando hasta el hipocampo. Sin embargo, el título de anticuerpos de forma aislada es poco probable que provoque un síndrome clínico. En un estudio reciente con inmunofluorescencia tisular y células transfectadas, se ha observado que hay diferencias en la afinidad por los VGKC entre el suero de pacientes con EL y aquellos con neuromiotonía. Los pacientes con EL tienen un anticuerpo que se une de forma preferente a los canales Kv1.1; sin embargo los pacientes con neuromiotonía tienen uno que se une a los canales Kv1.2 o Kv1.6. Aunque esto no acaba de explicar del todo el fenotipo de estos pacientes, sí que aporta información sobre la hipótesis planteada en el momento de obtener los resultados que se exponen en esta tesis, en relación a cómo la especificidad de estos autoanticuerpos puede determinar las diferentes manifestaciones clínicas de estos síndromes.

En el caso de los sueros de pacientes con neuromiotonía, se ha demostrado la unión entre los anticuerpos y las áreas yuxtaparanodales de axones mielinizados. Dado que estas zonas están llenas de canales Kv1.1 y Kv1.2²⁸³ y pueden contribuir a la repolarización de los axones²⁸⁴, una función disminuida de estas áreas daría lugar a una hiperexcitabilidad. A pesar de todo, no todos los sueros con neuromiotonía mostraban una unión específica a los nódulos

yuxtaparanodales, también se ha observado en pacientes que no tienen síntomas de neuromiotonía y con una EL, por lo que habría que determinar que característica es específica. En el caso de los sueros de pacientes con una EL, se obtuvieron zonas de inmunotinción en áreas llenas de canales Kv1.1 como la capa granular cerebelosa, el tercio interior de la capa molecular del hipocampo y la zona CA3 de fibras musgosas. Así pues, en la EL los anticuerpos anti-VGKC reconocen los Kv1.1 que, al estar localizados en el hipocampo, se han implicado funcionalmente en la excitabilidad y en la memoria²⁸⁵.

Aunque, es importante destacar que la relación de los canales Kv1.1 con la encefalitis límbica y la de los canales Kv1.2 con la neuromiotonía, no son el único factor que debe existir para predisponer a la presencia de manifestaciones periféricas o centrales. Es intrigante preguntarse porqué ciertos pacientes con anticuerpos anti-VGCC tienen una DCP y otros tienen un SMEL; al igual que porqué ciertos pacientes con anticuerpos anti-VGKC tienen una EL y no una neuromiotonía. La diferente afectación del SNP o SNC en pacientes con aparentemente los mismos anticuerpos invita a reflexionar sobre diferencias interindividuales entre pacientes en relación a la etiología del trastorno, la permeabilidad de la BHE, la heterogeneidad de la composición de los canales iónicos según el tejido (SNP o SNC), la diferente especificidad de los anticuerpos y su reactividad en las diferentes subunidades de los canales, la afinidad de los receptores a ciertas concentraciones de anticuerpo, la técnica utilizada para la detección de anticuerpos o la plasticidad tisular específica en la expresión de receptores de forma compensatoria.

Aunque algunos sueros de pacientes con neuromiotonía y la mayoría de los sueros de pacientes con una EL se asocian a la presencia de bandas oligoclonales en el LCR, demostrándose quizá una síntesis intratecal, en general las bandas oligoclonales en LCR se emparejan con bandas oligoclonales séricas. Esto indica que los anticuerpos anti-VGKC probablemente pasen la BHE

hacia el SNC por la elevada concentración de anticuerpos séricos en comparación con los niveles en LCR. Esto se ha demostrado en anticuerpos contra los receptores del glutamato en la encefalitis de Rasmussen²⁸⁶. Por otro lado, en unos estudios previos, se observó como con suero de pacientes con una EL, se marcaba no sólo el hipocampo sino también áreas cerebelosas, que clínicamente no tienen significado²⁸⁷. Esto además podría sugerir que algunas áreas del SNC pueden ser más accesibles a la presencia de anticuerpos Kv1.1 circulantes, o que estas áreas tengan más tendencia a aumentar su excitabilidad una vez se ha comprometido la función del canal Kv1. Es decir, que existan diferentes sensibilidades de la función neuronal a la pérdida de los VGKC, probablemente por la presencia de diferentes tipos de canales de K⁺ en cada zona cerebral, regulando cada uno diferentes umbrales de excitabilidad y funciones. En la práctica, algo que puede tener un significado fisiopatológico es que la presencia de estos anticuerpos anti-VGKC en una EL idiopática, predice una buena respuesta al tratamiento inmunomodulador, y una recuperación del paciente dada la ausencia de lesión neuronal.

Aportaciones posteriores: otras canalopatías autoinmunes del SNC.

Posteriormente a nuestro estudio, se han asociado otros anticuerpos a la encefalitis límbica²⁸⁸. Se identificó mediante inmunohistoquímica con inmunomarcaje un anticuerpo que, a diferencia de los anticuerpos antineuronales clásicos, no reaccionaba con el núcleo o citoplasma de las neuronas, sino que lo hacía con el neuropilo del hipocampo o cerebelo, en un grupo de pacientes, clínicamente heterogéneo, con encefalitis límbica. La caracterización preliminar de estos antígenos neuropilo indicó que son diversos y se expresan en la membrana neuronal y las dendritas en regiones ricas en sinápsis; además no se colocalizan, según los autores, con los VGKC, sino que lo hacen parcialmente con la espinofilina, una proteína post-sináptica dendrítica. Clínicamente, se consideró como un síndrome paraneoplásico tras

diagnosticarse un tumor. En todos los LCR, existía una pleocitosis con síntesis intratecal del anticuerpo. Todos los pacientes se recuperaron con tratamiento antitumoral, inmunosupresor o ambos. En definitiva, en este estudio inicial en un grupo de pacientes con una encefalitis límbica, se encontró la presencia de un anticuerpo antineuropilo que no se pudo caracterizar dado que la muestra clínica era heterogénea y variable.

Tras el hallazgo de este antígeno de membrana y dendrítico antineuropilo, se identificaron unas pacientes con un síndrome clínico más homogéneo correspondiente a una encefalitis que podría ser candidata a ser una canalopatía autoinmune del SNC. En una serie de mujeres que presentaron síntomas compatibles con una encefalitis, se les diagnosticó un anticuerpo tanto en LCR como en suero que marcaba también el neuropilo del hipocampo. Se orientó como una encefalitis paraneoplásica hallándose un teratoma de ovario (maduro o inmaduro), o en un caso un teratoma maduro en el mediastino. En estas pacientes los anticuerpos reaccionaron con antígenos de la membrana neuronal, sobretudo en la capa molecular del hipocampo; demostrándose que los anticuerpos reaccionaban contra epítomos de la superficie celular. Concretamente, se marcaban anticuerpos de las neuronas del hipocampo que reaccionaban con los receptores del N-metil-D-aspartato (rNMDA), sobretudo con la subunidad NR2B, y en menor medida con la subunidad NR2A²⁸⁹.

El receptor del NMDA está formado por heterómeros de la subunidad NR1 (que se une a la glicina) y de la subunidad NR2 (que se une al glutamato). Ambas subunidades son necesarias para crear un receptor funcional que contiene dos subunidades NR1 y dos subunidades NR2. Hay cuatro subunidades NR2 que tienen de un 50% a un 70% de identidad de secuencia en el dominio extracelular compartida (ej. la subunidad NR2B es en un 70% idéntica a la subunidad NR2A). Estas subunidades NR2 están codificadas por 4 genes diferentes y muestran variabilidad regional y durante el desarrollo. La subunidad NR2B se expresa

mucho en el periodo prenatal y disminuye en el periodo post-natal. Durante la disminución del NR2B aumentan el NR2A y el NR2C. Con la madurez, muchos de los receptores NR1/NR2B se convierten en extrasinápticos en las neuronas del hipocampo y el NR1/NR2A/NR2B se convierte en el mayor receptor sináptico del hipocampo y la zona frontal del cerebro. La subunidad NR2B se une al glutamato y forma heterómeros (NR1/NR2B o NR1/NR2A/NR2B) que se expresan en el cerebro frontal e hipocampo. Dicha asociación permite sugerir que los epítomos son conformacionales. El hallazgo de los anticuerpos relacionados con la subunidad NR2B del rNMDA en suero y LCR de los pacientes estudiados nos aporta una posible prueba diagnóstica sugiriendo que la disfunción del receptor es inmunomediada. El rNMDA está implicado en la transmisión y remodelación sináptica, el crecimiento dendrítico y la potenciación de la función del hipocampo, directamente relacionada con la formación de memoria y el aprendizaje. Además, los rNMDA median la excitotoxicidad, y su disfunción se ha asociado con trastornos clínicos como la esquizofrenia, la epilepsia y algunos tipos de demencia. Estos pacientes suelen presentar episodios paranoicos, alucinaciones y disquinesias. Dichos síntomas son frecuentes en el lupus neuropsiquiátrico. En algunos pacientes con lupus neuropsiquiátrico, se han identificado anticuerpos contra las subunidades NR2 del receptor del NMDA²⁹⁰. En este trastorno, los epítomos diana son diferentes. Dichos anticuerpos son anticuerpos anti-ADN de doble cadena que reaccionan con un único epítomo presente en las subunidades NR2A y NR2B, causando muerte neuronal por apoptosis²⁹¹. En estas pacientes con encefalitis, los síntomas clínicos eran muy diferentes a los típicamente asociados al lupus neuropsiquiátrico y no tenían anticuerpos anti-ADN de doble hélice.

Aunque los mecanismos patogénicos no son conocidos, se puede pensar que la expresión ectópica de las subunidades NR2 por tejido nervioso que contienen los teratomas, pueda ser lo que rompa la tolerancia inmunológica; considerando que quizá una predisposición genética o los cambios inmunológicos tras una

infección vírica puedan ayudar. El papel patogénico de los anticuerpos anti-NR2-rNMDA se puede sugerir por: (1) la existencia de modelos animales en el caso del lupus neuropsiquiátrico (aunque los epítomos son diferentes); (2) la correlación entre los síntomas de los pacientes y los títulos de anticuerpos; y (3) la demostración de la presencia de depósitos de IgG en el hipocampo y la amígdala del paciente autopsiado siguiendo un patrón similar al marcaje con suero de pacientes visto en las secciones de cerebro de rata.

Hasta ahora, la mayoría de las encefalitis paraneoplásicas se han asociado a anticuerpos contra proteínas onconeuronales intracelulares mediante un mecanismo citotóxico mediado por células T contra esas mismas proteínas. Estos trastornos se asocian habitualmente a tumores malignos y no responden bien a tratamientos con inmunosupresores o incluso tratamientos contra el cáncer. Sin embargo, esta nueva encefalitis mediada por anticuerpos anti-rNMDA/NR2B responde bien al tratamiento quirúrgico con resección tumoral asociado a inmunoterapia, por lo tanto a nivel terapéutico es importante tenerlo en cuenta para poder identificar, diagnosticar y tratar a estas pacientes de forma precoz. Finalmente, es interesante también empezar a conocer mejor la función de ciertas subunidades de los receptores NMDA, concretamente la NR2B, mediante la existencia de dichos anticuerpos, dado que nos ayudan a comprender la función fisiológica de dichos receptores, puesto que parecen estar implicados en la memoria, la conciencia y en las emociones.

Actualmente, dado el aumento y diferencias de todos los nuevos anticuerpos, aquellos asociados con una encefalitis límbica deben cumplir estos requisitos para ser incluidos en la nueva categoría de antígenos neuronales propuestos por Ances y colaboradores: la reactividad tiene que estar reducida al hipocampo, la reactividad se pierde en el inmunoblot o se fija con acetona o acetona+metanol, los antígenos deben estar en la superficie celular y los niveles de anticuerpos

deben desaparecer al mejorar los síntomas neurológicos. Aún hay autoantígenos por caracterizar pero todos tienen una expresión importante en el hipocampo.

La neuromielitis óptica (NMO) es un síndrome clínico caracterizado por una mielitis transversa aguda asociada a una neuritis óptica aguda o subaguda, con o sin recuperación, que suele cursar con brotes de ceguera y parálisis. Tras la descripción inicial de Devic y Gault, se consideró la NMO como un tipo de esclerosis múltiple. Últimamente, se han revisado los criterios diagnósticos, a raíz de una serie de resultados, que la han situado como una entidad diferente²⁹². No se ha encontrado una etiología específica para el síndrome, aunque se han propuesto varias.

Los criterios diagnósticos revisados propuestos por Wingerchuk son:

Tabla 19. Criterios diagnósticos de la neuromielitis óptica (según Wingerchuk *et al.*, 2005)

Criterios Absolutos	<ul style="list-style-type: none"> • Neuritis óptica. • Mielitis aguda • Sin evidencia de enfermedad fuera del nervio óptico o médula espinal 	
Criterios de Soporte	Mayores	<ul style="list-style-type: none"> a) lesión medular continua en RM extendiéndose sobre ≥ 3 segmentos vertebrales. b) RM cerebral que no cumpla criterios de esclerosis múltiple. c) Presencia de IgG-NMO positiva.
	menores	<ul style="list-style-type: none"> a) Neuritis óptica bilateral b) Neuritis óptica grave con agudeza visual fija peor que 20/200 en al menos un ojo. c) Debilidad grave en una o más extremidades (MRC <2)

El diagnóstico requiere de la presencia de todos los criterios absolutos y un criterio de soporte mayor o dos criterios de soporte menores.

Se ha observado que los anticuerpos séricos IgG-NMO que se encuentran en la NMO, se unen selectivamente al canal proteico de agua no sensible al mercurio, acuaporina 4 (AQP4), que se localiza en las proyecciones de los pies de los astrocitos en la barrera hematoencefálica (BHE)²⁹³. La acuaporina 4 es el canal predominante en el cerebro que permite el flujo de agua, teniendo una importante función en la homeostasis del agua cerebral. Las acuaporinas regulan el flujo de agua a través de la membrana de la célula, que es impermeable al agua. También se expresan en otros tejidos (estómago, riñón, pulmón, músculo esquelético y oído interno). En el cerebro, la AQP4 está implicada en el desarrollo, función e integridad de la interfase entre cerebro y sangre y entre cerebro y LCR. Aunque originalmente se había restringido la afectación de la NMO a los nervios ópticos y la médula espinal, hay estudios recientes que muestran como un 60% de estos pacientes tienen lesiones cerebrales y cumplen los criterios de NMO (a excepción, claro de estas lesiones)²⁹⁴. Si se estudia la localización y características de las lesiones cerebrales, se observa que están alrededor del tercer y cuarto ventrículo, que son las zonas donde se sabe que se localizan los canales que permiten el flujo de agua dependientes de la AQP4²⁹⁵. Se sabe que la NMO cumple criterios de ser una enfermedad mediada por anticuerpos (efectos beneficiosos de la plasmaféresis y del tratamiento anti-células B). La presencia de esto apoya la hipótesis de que la zona de más afectación por los anticuerpos, es aquella cercana a la BHE. Se podría considerar la neuromielitis óptica como otro síndrome candidato a ser una canalopatía autoinmune del SNC.

Tras analizar los síndromes clínicos que podrían ser canalopatías autoinmunes, tanto a raíz de los resultados de esta tesis como de las aportaciones posteriores a la misma, se pueden considerar como posibles canalopatías autoinmunes del SNC aquellas que se desglosan en la Tabla 20. Sigue sin dilucidarse la relación entre el sistema inmune y el SNC, es decir, si los anticuerpos pueden acceder al SNC y causar una disfunción del canal directamente o si se sintetizan en el SNC, aunque parece que se trata de anticuerpos con una función patogénica y con dianas inmunológicas extracelulares. A nivel práctico, dichos anticuerpos pueden ser importantes marcadores diagnósticos para identificar a pacientes con un trastorno autoinmune que es potencialmente tratable. Por lo tanto, aunque aun no se comprenda completamente la función de los anticuerpos en dichos trastornos, se deben tener en cuenta en el momento de diagnosticar a un paciente con un síndrome que se parezca a las cuatro canalopatías mencionadas dada la mejoría clínica que se puede conseguir con el tratamiento sintomático e inmunosupresor.

Tabla 20. Posibles canalopatías autoinmunes del SNC

Canalopatías Autoinmunes del SNC	Anti-anticuerpo asociado	Diana inmunológica	Respuesta Inmunoterapia
Degeneración cerebelosa subaguda (DCP)	Anti-VGCC tipo P/Q	Capa Molecular – Neurona Purkinje en el cerebelo	NO
Encefalitis límbica (EL)	Anti-VGKC (Kv1.1)	Capa granular cerebelo, capa molecular hipocampo.	SI
Encefalitis	Anti-rNMDA (NR2B)	Hipocampo, amígdala	SI
Neuromielitis óptica (NMO)	Anti-AQP4	Astrocitos, médula, nervio óptico (BHE)	SI

Anticuerpos como marcadores diagnósticos: anticuerpo nuclear antiglial (AGNA) y el antígeno SOX1

Al estudiar la inmunidad y el cáncer podemos encontrar dos tipos de anticuerpos. Los patógenos son aquellos que definen un síndrome neurológico y suelen estar localizados en la membrana celular. Los no patógenos son aquellos que no se asocian a un síndrome neurológico específicamente y suelen ser intracelulares. Ambos tipos de anticuerpos son importantes dado que los anticuerpos no patógenos pueden ser posibles dianas inmunológicas y servir como marcador diagnóstico. Este es el caso del anticuerpo nuclear anti-glial (AGNA). La distribución de los SPN asociados con AGNA es variable según el anticuerpo onconeuronal asociado (anti-Hu, anti-CV2/CRMP5). Hay una mayor asociación del AGNA al SMEL. Aunque algunos pacientes con un CPCP y un SMEL puedan tener anticuerpos anti-Hu^{296, 297}, anti-Ri, anti-CV2/CRMP5 o anti-Zic4, AGNA se detectó en un 43% de nuestra serie de SMEL y CPCP. Además, en estos pacientes se detectaron también anti-VGCC. Esto podría indicar que la respuesta inmune a los diferentes antígenos tumorales pueda estar ligada de alguna manera. Sin embargo, la ausencia de AGNA en el suero de pacientes con un SMEL no paraneoplásico, sugiere que el AGNA está inducido por el CPCP independientemente de los anticuerpos anti-VGCC. Esto se ha corroborado con la identificación del antígeno, SOX1, que reconoce el AGNA en la glia de Bergmann en el cerebelo, y que se encuentra elevado en pacientes con SMEL²⁹⁸. Los anticuerpos contra SOX1 son muy específicos para predecir la presencia de un cáncer de pulmón de célula pequeña subyacente. SOX1 pertenece a una familia de genes que se clasifican de los grupos A a la H, y dentro de estos al grupo B1. SOXB1 codifica proteínas de unión al ADN que regulan la transcripción de genes diana y están expresados en el sistema nervioso en desarrollo y neuroectodermo. Así pues, la inmunidad contra SOX1 en pacientes con SMEL paraneoplásico es mayor que la esperada por la simple presencia de un CPCP a pesar de que el tumor es fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune, como se había observado en el estudio presentado en

esta tesis. Curiosamente, a diferencia de los pacientes con anticuerpos anti-VGCC, no hay una mayor frecuencia de anticuerpos SOX1 en pacientes con síndromes neurológicos paraneoplásicos asociados a Hu y CPCP, por lo que deben existir diferencias interindividuales que determinan el tipo de respuesta inmune asociada a un CPCP. Este hallazgo permitirá controlar la evolución de pacientes con SMEL sin un cáncer diagnosticado, confirmándose un CPCP en caso de presencia de anticuerpos SOX1.

G. CONCLUSIONES

- 1. Los anticuerpos contra canales de calcio tipo P/Q dependientes de voltaje son un marcador útil para el diagnóstico de pacientes con degeneración cerebelosa paraneoplásica asociada a neoplasia de pulmón de célula pequeña, estando presentes en un 41% de los pacientes.**
- 2. Se debería investigar la presencia de anticuerpos contra canales de calcio tipo P/Q dependientes de voltaje en pacientes con una sospecha de degeneración cerebelosa paraneoplásica aún y cuando no esté presente un síndrome miasténico de Eaton-Lambert, dado que no hay un fenotipo clínico característico que identifique a dichos pacientes.**
- 3. Los anticuerpos contra canales de potasio dependientes de voltaje a títulos altos en pacientes con encefalitis límbica, no predicen la presencia de una neoplasia, puede tratarse de un trastorno idiopático autoinmune.**
- 4. La presencia de anticuerpos contra canales de potasio dependientes de voltaje en pacientes con encefalitis límbica, donde no se encuentra la presencia de un cáncer, implica una mejor respuesta a la inmunoterapia y un mejor pronóstico.**
- 5. La presencia del anticuerpo nuclear anti-glial (AGNA) es un buen marcador para sugerir la presencia de una neoplasia de pulmón en pacientes con un síndrome miasténico de Eaton-Lambert.**

H. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kullmann DM. The neuronal channelopathies. *Brain* 2002; 125:1177-1195.
- 2 Li M, Lester HA. Ion channel diseases of the central nervous system. *CNS Drug Rev.* 2001; 7: 214-40
- 3 Cooper EC, Jan LY. Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects and challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1999; 96: 4759-4766
- 4 Ptáček LJ. Channelopathies ion channel disorders of muscle as a paradigm for paroxysmal disorders of the nervous system. *Neuromusc Disord* 1997; 7: 250-5
- 5 Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science*. 4ed New York: McGraw Hill 2000
- 6 Neher E, Sakermann B. Single-channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibers. *Nature* 1976; 260: 799-802
- 7 Hille B, Catterall WA. Electrical excitability and ion channels. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fischer SK, Uhler MD, editors. *Basic neurochemistry*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1999. pp 119-137
- 8 Koester J. Membrane potential. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of neural science*, New York: McGraw-Hill, 2000. pp. 125-139
- 9 Ackerman MJ, Clapham DE. Ion channels, basic science and clinical disease. *NEJM* 1997; 336: 1575-86

-
- 10 Hogg RC, Buisson B, Bertrand D. Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1267-1276
 - 11 Meyer TM, Munsch T, Pape HC. Activity-related changes in intracellular pH in rat thalamic relay neurons. *Neuroreport* 2000; 11: 33-37
 - 12 Ashcroft FM. *Ion channels and disease*. San Diego: Academic Press; 2000
 - 13 Goldin AL. Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 871-94
 - 14 Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Tsien RW. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 1994; 13: 505-6
 - 15 Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 397-409
 - 16 Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 2003; 4: 207
 - 17 Greenberg DA. Calcium channels in neurological disease. *Ann Neurol* 1997; 42: 275-82
 - 18 Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000; 25: 533-35
 - 19 Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E. International union of pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev*. 2003; 55: 579-581

-
- 20 White JA, McAlpine PJ, Antonarakis S, Cann H, Eppig JT, Frazer K, Frezal J, Lancet D, Nahmias J, Pearson P, et al. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 1997; 45: 468-71
 - 21 Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 1984; 312: 121-7
 - 22 Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins TR, Black JA. Sodium channels and their genes: dynamic expression in the normal nervous system, dysregulation in disease states. *Brain Research* 2000; 886: 5-14
 - 23 Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989; 339: 597-603.
 - 24 Yang NB, George AL Jr, Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996; 16: 113-122
 - 25 Kuo CC, Bean BP. Na⁺ channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron* 1994; 12: 819-829
 - 26 Isom LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 2001; 7: 42-54
 - 27 Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 1995; 65: 493-531
 - 28 Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 521-555

-
- 29 Khosravani H, Zamponi GW. Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev* 2006; 86: 941-966
 - 30 Lory P, Ophoff RA, Nahmias J. Towards a unified nomenclature describing voltage-gated calcium channels. *Hum Genet* 1997; 100: 149-150
 - 31 Trimmer JS, Rhodes KJ. Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 477-519
 - 32 Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different agonist sensitivity. *Nature* 1985; 316: 440-3
 - 33 Bonci A, Grillner P, Mercuri NB, Bernardi G. L-type calcium channels mediate slow excitatory synaptic transmission in rat midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 6693-703
 - 34 Llinas R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1689-93
 - 35 Randall A, Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 1995; 15: 2995-3012
 - 36 Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M, Llinas RR. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7076-7080
 - 37 Wheeler DB, Randall A, Sather WA, Tsien RW. Neuronal calcium channels encoded by the alpha 1A subunit and their contribution to the excitatory synaptic transmission in the CNS. *Prog Brain Res* 1995; 105: 65-78

-
- 38 Sugiura Y, Woppmann A, Miljanich GP, Ko CP. A novel omega-conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurocytol* 1995; 24: 15-27
- 39 Llinas R, Yarom Y. Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. *J Physiol* 1981; 315: 569-84
- 40 Richter TA, Kolaj M, Renaud LP. Low voltage-activated Ca^{2+} channels are coupled to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in rat thalamic midline neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 8267–8271
- 41 Isope P, Murphy TH. Low threshold calcium currents in rat cerebellar Purkinje cell dendritic spines are mediated by T-type calcium channels. *J Physiol* 2005; 562: 257–269
- 42 Karst H, Joels M, Wadman WJ. Low-threshold calcium current in dendrites of the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1993; 164: 154–158
- 43 Kavalali ET, Zhuo M, Bito H, Tsien RW. Dendritic Ca^{2+} channels characterized by recordings from isolated hippocampal dendritic segments. *Neuron* 1997;18: 651–663
- 44 Joksovic PM, Bayliss DA, Todorovic SM. Different kinetic properties of two T-type Ca^{2+} currents of reticular thalamic neurons and their modulation by enflurane. *J Physiol* 2005; 566: 125–142
- 45 Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel molecular basis of K^{+} conduction and selectivity. *Science* 1998; 280: 69-77
- 46 Gutman GA, Chandy KG. Nomenclature for vertebrate voltage-gated K^{+} channels. *Sem Neurosci* 1993; 5: 101-106

-
- 47 Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS, International Union of Pharmacology. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 583-6
- 48 Zuberi SM, Eunson LH, Spauschus A, De Silva R, Tolmie J, Wood NW, McWilliam RC, Stephenson JP, Kullmann DM, Hanna MG. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with epilepsy. *Brain* 1999; 122: 817-25.
- 49 Coleman SK, Newcombe J, Pryke J, Dolly JO. Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *J Neurochem* 1999; 73: 849-58
- 50 Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002; 419: 35-42
- 51 Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952; 117: 500-544
- 52 Grippo J, Grippo T. Canalopatías en neurología. *Rev Neurol* 2001; 33: 643-47
- 53 George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Investig* 2005; 115: 1990-1999
- 54 Cannon SC. Physiologic principles underlying ion channelopathies. *Neurotherapeutics* 2007; 4: 174-83
- 55 Kass RS. The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J Clin Investig* 2005; 115: 1986-89

-
- 56 Hoffman EP, Lehmann-Horn F, Rüdell R. Overexcited or inactive: ion channels in muscle diseases. *Cell* 1995; 80: 681-686
- 57 Streib EW. Differential diagnosis of myotonic syndromes. *Muscle Nerve* 1987; 10: 603-615
- 58 Rudel R, Ricker K, Lehmann-Horn F. Genotype-phenotype correlations in human skeletal muscle sodium channel diseases. *Arch Neurol* 1993; 50: 1241-1248
- 59 Fontaine B, Khurana TS, Hoffman EP, Bruns GA, Haines JL, Trofatter JA, Hanson MP, Rich J, McFarlane H, Yasek DM, et al. Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha subunit gene. *Science* 1990; 250: 1000-1002
- 60 Ebers GC, George AL, Barchi RL, Ting-Passador SS, Kallen RG, Lathrop GM, Beckmann JS, Hahn AF, Brown WF, Campbell RD, et al. Paramyotonia congenita and non-myotonic hyperkalemic periodic paralysis are linked to the adult muscle sodium channel gene. *Ann Neurol* 1991; 30: 810-816
- 61 Bendahhou S, Cummins TR, Hahn AF, Langlois S, Waxman SG, Ptacek LJ. A double mutation in families with periodic paralysis defines new aspects of sodium channel slow inactivation. *J Clin Invest* 2000; 106: 431-438
- 62 Cummins TR, Sigworth FJ. Impaired slow inactivation in mutant sodium channels. *Biophys* 1996; 91: 227-36
- 63 Jackson CE, Barohn RJ, Ptacek LJ. Paramyotonia congenita: abnormal short exercise test and improvement after mexiletine therapy. *Muscle Nerve* 1994; 17: 763-768.
- 64 Takahashi MP, Cannon SC. Mexiletine block of disease-associated mutations in S6 segments of human skeletal muscle Na⁺ channel. *J Physiol* 2001; 537: 701-714

-
- 65 Rosenfeld J, Sloan-Brown K, George AL Jr. A novel muscle sodium channel mutation causes painful congenital myotonia. *Ann Neurol* 1997; 42: 811-814
- 66 Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Muscle channelopathies and critical points in functional genetic studies. *J Clin Investig* 2005; 115: 2000-09
- 67 Tsujino A, Maertens C, Ohno K, Shen XM, Fukuda T, Harper CM, Cannon SC, Engel AG. Myasthenic syndrome caused by the mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 7377-7382
- 68 Catterall WA. Molecular properties of brain sodium channels, an important target for anticonvulsant drugs. *Adv Neurol* 1999; 79: 441-456
- 69 Heron SE, Crossland KM, Andermann E, Phillips HA, Hall AJ, Bleasel A, Shevell M, Mercho S, Seni MH, Guiot MC, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE. Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 2002; 360: 851-2
- 70 Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmidiotis G, Gardner A, Sutherland GR, George AL Jr, Mulley JC, Berkovic SF. Neuronal sodium-channel alpha1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 859-65.
- 71 Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, Gambardella A, Steinlein OK, Grinton BE, Dean JT, Bordo L, Hodgson BL, Yamamoto T, Mulley JC, Zara F, Scheffer IE. Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol* 2004; 55: 550-7
- 72 Waxman SG. Acquired channelopathies in nerve injury and MS. *Neurology* 2001; 56: 1621-1627

-
- 73 Waxman SG, Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA. Sodium channels and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7635-7639
- 74 Coward K, Plumpton C, Facer P, Birch R, Carlstedt T, Tate S, Bountra C, Anand P. Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states. *Pain* 2000; 85: 41-50
- 75 Felts PA, Baker TA, Smith KJ. Conduction in segmentally demyelinated mammalian central axons. *J Neurosci* 1997; 17: 7267-7277
- 76 McKeown L, Robinson P, Jones OT. Molecular basis of inherited calcium channelopathies: role of mutations in pore-forming subunits. *Acta Pharmacologica Sinica* 2006; 27: 799-812
- 77 Pietrobon D. Calcium channels and channelopathies of the central nervous system. *Mol Neurobiol* 2002; 25: 31-5
- 78 Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 1996; 87: 543-552
- 79 van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, van de Ven RC, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ, Frants RR, Ferrari MD. A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 2004; 41: 701-10
- 80 Guida S, Trettel F, Pagnutti S, Mantuano E, Tottene A, Veneziano L, et al. Complete loss of P/Q calcium channel activity caused by a CACNA1A missense mutation carried by patients with episodic ataxia type 2. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 759-64

-
- 81 Imbrici P, Jaffe SL, Eunson LH, Davies NP, Herd JC, Robertson R, Kullmann DM, Hanna MG. Dysfunction of the brain calcium channel Cav2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia. *Brain* 2004; 127: 2682-92
- 82 Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 1997; 15: 62-9
- 83 Matsuyama Z, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Komure O, et al. Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1283-87
- 84 Yue Q, Jen JC, Nelson SF, Baloh RW. Progressive ataxia due to missense mutation in a calcium-channel gene. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1078-87
- 85 Seeböhm G. Activators of cation channels: potential in treatment of channelopathies. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 585-588
- 86 Browne DL, Ganchar ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, Litt M. Episodic ataxia/myokimia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet* 1994; 8: 136-40
- 87 Zuberi SM, Eunson LH, Spauschus A, De Silva R, Tolmie J, Wood NW, McWilliam RC, Stephenson JB, Kullmann DM, Hanna MG. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain* 1999; 122: 817-25
- 88 Zerr P, Adelman JP, Maylie J. Episodic ataxia mutations in Kv1.1 alter potassium channel function by dominant negative effects of haploinsufficiency. *J Neurosci* 1998; 18: 2842-48

-
- 89 Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, Schwartzkroin PA, Messing A, Tempel BL. Deletion of the K(v)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron* 1998; 20: 809-19
- 90 Cannon SC. Pathomechanisms in channelopathies of skeletal muscle and brain. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29: 387-415
- 91 Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 1998; 282: 1890-93
- 92 Leppert M, Anderson VE, Quattlebaum T, Stauffer D, O'Connell P, Nakamura Y, Lalouel JM, White R. Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature* 1989, 337: 647-48
- 93 Lewis TB, Leach RJ, Ward K, O'Connell P, Ryan SG. Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q. *Am J Hum Genet* 1993, 53: 670-75
- 94 Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 1998; 279: 403-6
- 95 Lerche H, Weber YG, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Ion channel defects in idiopathic epilepsies. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 2737-52
- 96 Ronen GM, Rosales TO, Connolly M, Anderson VE, Leppert M. Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology* 1993; 43: 1355-60
- 97 Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Luders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB, Wang QK. Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet* 2005; 37: 733-38

-
- 98 Vincent A. Measuring and evaluating the significance of autoantibodies in neurological disorders. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2002; 3: 127-151
 - 99 Lang B, Dale RC, Vincent A. New autoantibody mediated disorders of the central nervous system. *Current Opinion in Neurology* 2003, 16: 351-57
 - 100 Posner JB, Dalmau JO. Paraneoplastic syndromes affecting the central nervous system. *Annu Rev Med* 1997; 48: 157-66
 - 101 Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Sillevius Smitt P, Vedeler Ch, Verschuuren JJGM, Vincent A, Voltz R. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1135-1140
 - 102 Dadparvar S, Anderson GS, Bhargava P, Guan L, Reich P, Alavi A, Zhuang H. Paraneoplastic encephalitis associated with cystic teratoma is detected by flurodeoxyglucose postron emission tomography with negative magnetic resonance image findings. *Clin Nucl Med* 2003; 28: 893-6
 - 103 Younes-Mhenni S, Janier MF, Cinotti L, Antoine JC, Tronc F, Cottin V, Ternamian PJ, Trouillas P, Honnorat J. FDG-PET improves tumour detection in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *Brain* 2004; 127: 2331-8
 - 104 Rees JH, Hain SF, Johnson MR, Hughes RA, Costa DC, Eil PJ, Keir G, Rudge P. The role of [18F]fluoro-2-deoxyglucose-PET scanning in the diagnosis of paraneoplastic neurological disorders. *Brain* 2001; 124: 2223-31
 - 105 Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, Escaramis G, Delattre JY. Anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 2001; 124: 1138-48

-
- 106 Wittram C, Fischman AJ, Mark E, Ko J, Shepard JA. Thymic enlargement and FDG uptake in three patients: CT and FDG positron emission tomography correlated with pathology. *AJR AM J Roentgenol* 2003; 180: 519-22
- 107 Wahl RL, Siegel BA, Coleman RE, Gatsonis CG; PET Study Group. Prospective multicenter study of axillary nodal staging by positron emission tomography in breast cancer: a report of the staging breast cancer with PET Study Group. *J Clin Oncol* 2004; 22: 277-85
- 108 Rojas I, Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, Delattre JY, Ramon JM, Dalmau J, Posner JB. Long-term clinical outcome of paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. *Neurology* 2000; 55: 713-5
- 109 Linke R, Schroeder M, Helmberger T, Voltz R. Antibody-positive paraneoplastic neurologic syndromes: value of CT and PET for tumor diagnosis. *Neurology* 2004; 63: 282-6
- 110 Dalmau J, Gultekin HS, Posner JB. Paraneoplastic neurologic syndromes: pathogenesis and physiopathology. *Brain Pathol* 1999; 9: 275-84
- 111 Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 2003; 349: 1543-54
- 112 Roberts WK, Darnell RB. Neuroimmunology of the paraneoplastic neurological degenerations. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 616-22
- 113 Roberts WK, Darnell RB. Neuroimmunology of the paraneoplastic neurological degenerations. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 616-22
- 114 Albert ML, Darnell RB. Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 36-44

-
- 115 Carpentier AF, Voltz R, Deschamps T, Posner JB, Dalmau J, Rosenfeld MR. Absence of HuD gene mutations in paraneoplastic small cell lung cancer tissue. *Neurology* 1998; 50: 1919
- 116 Byrne T, Mason WP, Posner JB, Dalmau J. Spontaneous neurological improvement in anti-Hu associated encephalomyelitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62: 276-8
- 117 Maddison P, Newsom-Davis J, Mills KR, Souhami RL. Favourable prognosis in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and small-cell lung carcinoma. *Lancet* 1999; 353: 117-8
- 118 Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology* 1992; 42: 1931-37
- 119 Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. Detection of anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer: a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol* 1990; 27: 544-552
- 120 Graus F, Dalmau J, Rene R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Vinolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, Mason WP, Rosell R, Posner JB, Real FX. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2866-72
- 121 Sommer C, Weishaupt A, Brinkoff H, Biko L, Wessig C, Gold R, Toyka KV. Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet* 2005; 365: 1406-1411
- 122 Albert ML, Austin LM, Darnell RB. Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 2000; 47: 9-17

-
- 123 Voltz R, Dalmau J, Posner JB, Rosenfeld MR. T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology* 1998; 51: 1146-50
- 124 Dalmau J, Furneaux HM, Rosenblum MK, Graus F, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in specific regions of the nervous system and tumor from patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy. *Neurology* 1991; 41: 1757-64
- 125 Hormigo A, Dalmau J, Rosenblum MK, River ME, Posner JB. Immunological and pathological study of anti-Ri associated encephalopathy. *Ann Neurol* 1994; 36: 896-902
- 126 Storstein A, Monstad SE, Honnorat J, Vedeler CA. Paraneoplastic antibodies detected by isoelectric focusing of cerebrospinal fluid and serum. *J Neuroimmunol* 2004; 155: 150-4
- 127 Furneaux HM, Reich L, Posner JB. Autoantibody synthesis in the central nervous system of patients with paraneoplastic syndromes. *Neurology* 1990; 40: 1085-1091
- 128 Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23-33
- 129 Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 126-34
- 130 Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 1998; 21: 505-20
- 131 Abudalkarim AS, Murray JA. Review article: the diagnosis of coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 987-995
- 132 Sollid LM, Jabri B. Is celiac disease an autoimmune disorder? *Current Opinión in Immunology* 2005; 17: 595-600

-
- 133 European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-911
- 134 Hadjivassiliou M, Boscolo S, Davies-Jones GA, Grünewald RA, Not T, Sanders DS, Simpson JE, Tongiorgi E, Williamson CA, Woodroffe NM. The humoral response in the pathogenesis of gluten ataxia. *Neurology* 2002; 58: 1221-1226
- 135 Burk K, Bosch S, Muller CA, Melms A, Zuhlke C, Stern M, Besenthal I, Skalej M, Ruck P, Ferber S, Klockgether T, Dichgans J. Sporadic cerebellar ataxia associated with gluten sensitivity. *Brain* 2001; 124:1013-9
- 136 Hadjivassiliou M, Davies-Jones GA, Sanders DS, Grünewald RA. Dietary treatment of gluten ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:1221-1224
- 137 Hadjivassiliou M, Grünewald R, Sharrack B, Sanders D, Lobo A, Williamson C, Woodroffe N, Wood N, Davies-Jones A. Gluten ataxia in perspective: epidemiology, genetic susceptibility and clinical characteristics. *Brain* 2003; 126: 685-91
- 138 Wilkinson ID, Hadjivassiliou M, Dickson JM, Wallis L, Grünewald RA, Coley SC, Widjaja E, Griffiths PD. Cerebellar abnormalities on proton MR spectroscopy in gluten ataxia. *J Neurol Neurosurg* 2005; 76: 1011-1013
- 139 Korponay-Szabo IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Kiraly R, Kovacs JB, Fesus L, Maki M. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut* 2004; 53: 641-8
- 140 Hadjivassiliou M, Mäki M, Sanders DS, Williamson CA, Grünewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabó IR. Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology* 2006; 66: 373-77

-
- 141 Freitag T, Schulze-Koops H, Niedobitek G, Melino G, Schuppan D. The role of the immune response against tissue transglutaminase in the pathogenesis of coeliac disease. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 13-20
- 142 Jacob S, Zarei M, Kenton A, Allroggen H. Gluten sensitivity and neuromyelitis optica: two case reports. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1028-1030
- 143 Palace J, Lang B. Epilepsy: an autoimmune disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69: 711-714
- 144 Andrews PI, Dichter MD, Berkovic SF, Newton MR, McNamara JO. Plasmapheresis in Rasmussen's encephalitis. *Neurology* 1996; 46: 242-6
- 145 Rogers SW, Andrews PI, Gahring LC, Whisenand T, Cauley K, Crain B, Hughes TE, Heinemann SF, McNamara JO. Autoantibodies to glutamate receptor RGLu3 in Rasmussen's encephalitis. *Science* 1994; 265: 648-51
- 146 Levite M, Hermelin A. Autoimmunity to the glutamate receptor in mice-a model for Rasmussen's encephalitis. *J Autoimmunity* 1999; 26: 648-51
- 147 Watson R, Jiang Y, Bermudez I, Houlihan L, Clover L, McKnight K, Cross JH, Hart IK, Roubertie A, Valmier J, Hart Y, Palace J, Beeson D, Vincent A, Lang B. Absence of antibodies to glutamate receptor type 3 (RGLu3) in Rasmussen encephalitis. *Neurology* 2004; 63: 43-50
- 148 Mantegazza R, Bernasconi P, Baggi F, Spreafico R, Ragona F, Antozzi C, Bernardi G, Granata T, The Italian Rasmussen's Encephalitis Study Group. Antibodies against GluR3 peptides are not specific for Rasmussen's encephalitis but are also present in epilepsy patients with severe, early onset disease and intractable seizures. *J Neuroimmunol* 2002; 131: 179-185

-
- 149 Bien CG, Bauer J, Deckwerth TL, Wiendl H, Deckert M, Wiestler OD, Schramm J, Elger CE, Lassman H. Destruction of neurons by cytotoxic T cells: a new pathogenic mechanism in Rasmussen's encephalitis. *Ann Neurol* 2002; 51: 311-8
- 150 Bernasconi P, Cipelletti B, Passerini L, Granata T, Antozzi C, Mantegazza R, Spreafico R. Similar binding to glutamate receptors by Rasmussen and partial epilepsy patients' sera. *Neurology* 2002; 59: 1998-2001
- 151 Ganor Y, Goldberg-Stern H, Amromd D, Lerman-Sagie T, Teichberg VI, Pelled D, Futerman AH, Zeev BB, Freilinger M, Verheulpen D, van Bogaert P, Levite M. Autoimmune epilepsy: some patients harbor autoantibodies to glutamate receptor and dsDNA on both sides of the blood-brain barrier, which may kill neurons and decrease in brain fluids after hemispherotomy. *Clin Dev Immunol* 2004; 11: 241-52
- 152 Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilla P. Auto-antibodies to GABAergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990; 322: 1555-60
- 153 Levy LM, Dalakas MC, Floeter MK. The stiff-person syndrome: an autoimmune disorder affecting neurotransmission of gamma-aminobutyric acid. *Ann Intern Med* 1999; 131: 522-30
- 154 Saiz A, Arpa J, Sagasti A, Casamitjana R, Zarranz JJ, Tolosa E, Graus F. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late-onset insulin-dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity. *Neurology* 1997; 49: 1026-30
- 155 Ances BM, Dalmau JO, Tsai J, Hasbani MJ, Galetta SL. Downbeating nystagmus and muscle spasms in patient with glutamic-acid decarboxylase antibodies. *Am J Ophthalmol* 2005; 140: 142-4
- 156 Vianello M, Tavolato B, Armani M, Giometto B. Cerebellar ataxia associated with anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies. *Cerebellum* 2003; 2: 77-9

-
- 157 Peltola J, Kulmala P, Isorjavi J, Saiz A, Latvala K, Palmio J, Savola K, Knip M, Keranen T, Graus F. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with therapy-resistant epilepsy. *Neurology* 2000; 55: 46-50
- 158 Dalakas MC, Fujii M, Li M, McElroy B. The clinical spectrum of anti-GAD antibody-positive patients with stiff-person syndrome. *Neurology* 2000; 55: 1531-1535
- 159 Chattopadhyay S, Ito M, Cooper JD, Brooks AI, Curran TM, Powers JM, Pearce DA. An autoantibody inhibitory to glutamic acid decarboxylase in the neurodegenerative disorder Batten disease. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1421-31
- 160 Vianello M, Tavolato B, Giometto B. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies and neurological disorders. *Neurol Sci* 2002; 23: 145-51
- 161 Lichte B, Veh RW, Meyer HE, Kilimann MW. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J* 1992; 11:2521-2530
- 162 De Camilli P, Thomas A, Cofield R, Folli F, Lichte B, Piccolo G, Meinck HM, Austoni M, Fassetta G, Bottazzo G, et al. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 1993; 178: 2219-23
- 163 Folli F, Solimena M, Cofield R, Austoni M, Tallini G, Fassetta G, Bates D, Cartlidge N, Bottazzo GF, Piccolo G, et al. Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the "stiff-man" syndrome and breast cancer. *N Engl J Med* 1993; 328: 546-51
- 164 Dropcho EJ. Anti-amphiphysin antibodies with small-cell lung carcinoma and paraneoplastic encephalomyelitis. *Ann Neurol* 1996; 39: 659-667

-
- 165 Saiz, A, Dalmau J, Husta Butler M, Chen Q, Delattre JY, De Camilli P, Graus F. Anti-amphiphysin I antibodies in patients with paraneoplastic neurological disorders associated with small cell lung carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 214-17
- 166 Pittock SJ, Lucchinetti CF, Parisi JE, Benarroch EE, Mokri B, Stephan CL, Kim KK, Kilimann MW, Lennon VA. Amphiphysin autoimmunity: paraneoplastic accompaniments. *Ann Neurol* 2005; 58: 96-107
- 167 Yu Z, Kryzer TJ, Griesmann GE, Kim K, Benarroch EE, Lennon VA. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. *Ann Neurol* 2001; 49: 146-154
- 168 Lee HR, Lennon VA, camillero M, Prather CM. Paraneoplastic gastrointestinal motor dysfunction: clinical and laboratory characteristics. *Am J Gastroenterology* 2001; 96: 373-379
- 169 Vernino S, Lennon VA. Ion channel and striational antibody define a continuum of autoimmune neuromuscular hyperexcitability. *Muscle Nerve* 2002; 2: 702-707
- 170 Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, O'Suilleabhain PE, Windebank AJ, Woppmann A, Miljanich GP, Lambert EH. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *New Engl J Med* 1995; 332: 1467-74
- 171 Pittock SJ, Kryzer TJ, Lennon VA. Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann Neurol* 2004; 56: 715-719
- 172 Group of the committee of Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease of the Young of the American Heart Association. *JAMA* 1992; 268: 2069-2073

-
- 173 Swedo SE, Leonard HL, Schapiro MB, Casey BJ, Mannheim GB, Leane MC, Rettew DC. Sydenham's chorea: physical and psychological symptoms of St. Vitus dance. *Pediatrics* 1993; 91: 706-713
- 174 Dale RC, Church AJ, Cardoso F, Goddard E, Cox TC, Chong WK, Williams A, Klein NJ, Neville BG, Thompson EJ, Giovannoni G. Post-streptococcal acute disseminated encephalomyelitis with basal ganglia involvement and auto-reactive antibasal ganglia antibodies. *Ann Neurol* 2001; 50: 588-595
- 175 Church AJ, Cardoso F, Dale RC, Lees AJ, Thompson EJ, Giovannoni G. Anti-basal ganglia antibodies in acute and persistent Sydenham's corea. *Neurology* 2002; 59: 227-31
- 176 Church AJ, Dale RC, Cardoso F, Candler PM, Chapman MD, Allen ML, Klein NJ, Lees AJ, Giovannoni G. CSF and serum immune parameters in Sydenham's chorea: evidence of an autoimmune syndrome. *J Neuroimmunol* 2003; 136: 149-53
- 177 Singer HS, Loiselle CR, Lee O, Garvey MA, Grus FH. Antibasal ganglia antibody abnormalities in Sydenham chorea. *J Neuroimmunol* 2003; 136: 154-161
- 178 Kirvan CA, Swedo SE, Heuser JS, Cunningham MW. Mimicry and autoantibody-mediated neuronal cell signaling in Sydenham chorea. *Nat Med* 2003; 9: 914-20
- 179 Fujinami RS, Sweeten TL. Letting antibodies get to your head. *Nat Med* 2003; 9: 823-25
- 180 O'Hanlon GM, Plomp JJ, Chakrabarti M, Morrison I, Wagner ER, Goodyear CS, Yin X, Trapp BD, Conner J, Molenaar PC, Stewart S, Rowan EG, Willison HJ. Anti-GQ1b ganglioside antibodies mediate complement dependent destruction of the motor nerve terminal. *Brain* 2001; 124: 893-906
- 181 Swedo SE, Leonard HL, Garvey M, Mittleman B, Allen AJ, Perlmutter S, Lougee L, Dow S, Zamkoff J, Dubbert BK. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with

-
- streptococcal infection: clinical description of the first 50 cases. *Am J Psychiatry* 1998; 155: 264-271
- 182 Mercadante MT, Campos MC, Marques-Dias MJ, Miguel EC, Leckman J. Vocal tics in Sydenham's chorea. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997; 36: 154: 110-112
- 183 DiFazio MP, Morales J, Davis R. Acute myoclonus secondary to group A beta-hemolytic streptococcus infection: a PANDAS variant. *J Child Neurol* 1998; 13: 516-518
- 184 Kurlan R. The PANDAS hypothesis: losing its bite? *Mov Disorders* 2004; 19: 371-74
- 185 Singer HS, Loiselle CR, Lee O, Minzer K, Swedo S, Grus FH. Anti-basal ganglia antibodies in PANDAS. *Mov Disord* 2004; 19: 406-415
- 186 Loiselle CR, Lee O, Moran TH, Singer HS. Striatal microinfusion of Tourette syndrome and PANDAS sera: failure to induce behavioral changes. *Mov Disorders* 2004; 19: 390-96
- 187 Hallett JJ, Harling-Berg CJ, Knopf PM, Stopa EG, Kiessling LS. Anti-striatal antibodies in Tourette's syndrome cause neuronal dysfunction. *J Neuroimmunol* 2000; 111: 195-202
- 188 Taylor JR, Morshed SA, Parveen S, Mercadante MT, Scahill L, Peterson BS, King RA, Leckman JF, Lombroso PJ. An animal model of Tourette's syndrome. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 657-60
- 189 Huerta PT, Kowal C, DeGiorgio LA, Volpe BT, Diamond B. Immunity and behavior: antibodies alter emotion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 678-683
- 190 Kirvan CA, Swedo SE, Snider LA, Cunningham MW. Antibody-mediated cell signaling in behavior and movement disorders. *J Neuroimmunol* 2006; 179: 173-179
- 191 Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 1993; 259: 780-785

-
- 192 Zhu G, Okada M, Yoshida S, Hirose S, Kaneko S. Pharmacological discrimination of protein kinase associated exocytosis mechanisms between dopamine and 3,4-dihydroxyphenylalanine in rat striatum using in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 2004; 363: 120-124
- 193 Chakrabarty K, Bhattacharyya S, Christopher R, Khanna S. Glutamatergic dysfunction in OCD. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 1735-40
- 194 Snider LA, Sachdev V, MaCkaronis JE, St Peter M, Swedo SE. Echocardiographic findings in the PANDAS subgroup. *Pediatrics* 2004; 114: e748-e751
- 195 von Economo C. Encephalitis lethargica. Its sequelae and treatment. Translated by K.O. Newman. London: Oxford University Press; 1931
- 196 Dale RC, Church AJ, Surtees RA, Lees AJ, Adcock JE, Harding B, Neville BG, Giovannoni G. Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity. *Brain* 2004; 127: 21-33
- 197 Kiley M, Esiri MM. A contemporary case of encephalitis lethargica. *Clin Neuropathol* 2001; 20: 2-7
- 198 Perlmutter SJ, Leitman SF, Garvey MA, Hamburger S, Feldman E, Leonard HL, et al. Therapeutic plasma exchange and intravenous immunoglobulin for obsessive-compulsive disorder and tic disorders in childhood. *Lancet* 1999; 354:1153-8
- 199 Blunt SB, Lane RJ, Turjanski N, Perkin GD. Clinical features and management of two cases of encephalitis lethargica. *Mov Disord* 1997; 12: 354-9
- 200 Araujo AQ, Silva MT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurology* 2006; 5: 1068-76

-
- 201 Jernigan M, Morcos Y, Lee SM, Dohan FC Jr, Raine C, Levin MC. IgG in brain correlates with clinicopathological damage in HTLV-1 associated neurological disease. *Neurology* 2003; 60: 1320-7
 - 202 Lee SM, Morcos Y, Jang H, Stuart JM, Levin MC. HTLV-1 induced molecular mimicry in neurological disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 296: 125-36
 - 203 Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *Neurology* 1976; 26: 1054-9
 - 204 Toyka KV, Brachman DB, Pestronk A, Kao I. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science* 1975; 190: 397-9
 - 205 Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993; 14: 426-430
 - 206 Marx A, Muller-Hermelink HK, Strobel P. The role of thymomas in the development of myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 2003; 998: 223-236
 - 207 Riemersma S, Vincent A, Beeson D, Newland C, Hawke S, Vernet-der Garabedian B, Eymard B, Newsom-Davis J. Association of arthrogryposis multiplex congenita with maternal antibodies inhibiting fetal acetylcholine receptor function. *J Clin Invest*, 1996; 98: 2358-63
 - 208 Vernino S, Low PA, Fealey RD, Stewart JD, Farrugia G, Lennon VA. Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *N Engl J Med* 2000; 343: 847-855
 - 209 Suarez GA, Fealey RD, Camilleri M, Low PA. Idiopathic autonomic neuropathy: clinical, neuropsychologic, and follow-up studies on 27 patients. *Neurology* 1994; 44: 1675-1682

-
- 210 Sandroni P, Vernino S, Klein CM et al. Idiopathic autonomic neuropathy: comparison of cases seropositive and seronegative for ganglionic acetylcholine receptor antibody. *Arch Neurol* 2004; 61: 44-48
- 211 Lennon VA, Ermilov LG, Sha L, Szurszewski JH, Vernino S. Immunization with neuronal nicotinic acetylcholine receptor induces neurological autoimmune disease. *J Clin Invest* 2003; 111: 907-913
- 212 Vernino S, Ermilov LG, Szurszewski JH, Low PA, Lennon VA. Passive transfer of autoimmune autonomic neuropathy to mice. *J Neurosci* 2004; 24: 7037-7042
- 213 Meriney SD, Hulsizer SC, Lennon VA, Grinnell AD. Lambert-Eaton myasthenic syndrome immunoglobulins react with multiple types of calcium channels in small-cell lung cancer. *Ann Neurol* 1996; 40:739-740
- 214 Motomura M, Johnson I, Lang B, Vincent A, Newsom-Davis J. An improved diagnostic assay for Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 58: 85-7
- 215 Wirtz PW, Willcox N, van der Silk AR, Lang B, Maddison P, Koeleman BP, Giphart MJ, Wintzen AR, Roep BO, Verschuuren JJ. Associated autoimmune diseases in patients with the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol* 2004; 251: 1255-1259
- 216 Wirtz PW, Willcox N, Roep BO, Lang B, Wintzen AR, Newsom-Davis J, Vershuuren JJ. HLA-B8 in patients with the Lambert-Eaton myasthenic syndrome reduces likelihood of associated small cell lung carcinoma. *Ann NY Acad Sci* 2003; 998: 200-201
- 217 Voltz R, Carpentier A, Rosenfeld M, Posner J, Dalmau J. P/Q-Type voltage-gated calcium channel antibodies in paraneoplastic disorders of the central nervous system. *Muscle Nerve* 1999, 22: 119-122

-
- 218 Takamori M, Maruta T, Komai K. Lambert-Eaton myasthenic syndrome as an autoimmune calcium-channelopathy. *Neurosci Res* 2000; 36: 183-91
- 219 Hewett SJ, Atchison WD. Specificity of Lambert-Eaton myasthenic syndrome immunoglobulin for nerve terminal calcium channels. *Brain Res* 1992; 599: 324-32
- 220 Lambert EH, Lennon VA. Selected IgG rapidly induces Lambert-Eaton myasthenic syndrome in mice: complement independence and EMG abnormalities. *Muscle Nerve* 1988; 11: 1133-1145
- 221 Waterman S, Lang B, Newsom-Davis J. Effect of Lambert-Eaton myasthenic syndrome antibodies in autonomic neurons in the mouse. *Ann Neurol* 1997; 42: 147-156
- 222 Takamori M. Lambert-Eaton myasthenic syndrome as an autoimmune calcium channelopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1347-1351
- 223 Vincent A, Beeson D, Lang B. Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmission. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6717-6728.
- 224 Maddison P, Lang B, Mills K, Newsom-Davis J. Long term outcome in Lambert-Eaton myasthenic syndrome without lung cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70: 212-217
- 225 Maddison P, Newsom-Davis J, Mills KR. Strength-duration properties of peripheral nerve in acquired neuromyotonia. *Muscle Nerve* 1999; 22: 823-830.
- 226 Vincent A. Understanding neuromyotonia. *Muscle Nerve* 2000; 23: 655-657
- 227 Liguori R, Vincent A, Clover L, Avoni P, Plazzi G, Cortelli P, Baruzzi A, Carey T, Gambetti P, Lugaresi E, Montagna P. Morvan's syndrome: peripheral and central nervous system cardiac involvement with antibodies to voltage-gated potassium channels. *Brain* 2001; 124: 2417-2426

-
- 228 Newsom-Davis J, Mills KR. Immunological associations of acquired neuromyotonia (Isaac's syndrome). *Brain* 1993; 116: 453-469
- 229 Martini R, Zielasek J, Toyka KV. Inherited demyelinating neuropathies: from gene to disease. *Curr Opin Neurol* 1998; 11: 545-556
- 230 Liguori R, Vincent A, Avoni P, Valentino ML, D'Alessandro R, Zaccaria A, Bandini G, Montagna P. Acquired neuromyotonia after bone-marrow transplantation. *Neurology* 2000; 54: 1390-1
- 231 Shillito P, Molenaar PC, Vincent A, Leys K, Zheng W, van den Berg RJ, Plomp JJ, Van Kemper GTHH, Chauplannaz G, Wintzen AR, van Dighk JG, Newsom-Davis J. Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K⁺ channels of peripheral nerves. *Ann Neurol* 1995; 38: 714-722
- 232 Kleopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K⁺ channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain* 2006; 129: 1570-1584
- 233 Tomimitsu H, Arimura K, Nagado T, Watanabe O, Otsuka R, Kurono A, Sonoda Y, Osame M, Kameyama M. Mechanism of action of voltage-gated K⁺ channel antibodies in acquired neuromyotonia. *Ann Neurol* 2004; 56: 440-444
- 234 Brouwer B. Beitrag zur Kenntnis der chronischen diffusen Kleinhirnerkrankungen. *Neurol Zentralbl* 1919; 38: 674-682
- 235 Brouwer B, Biemond A. Les affections parenchymateuses du cervelet et leur signification du point de vue de l'anatomie et la physiologie de cet organe. *J Belg Neurol Psychiatrie* 1938; 38: 691-757

-
- 236 Brain WR, Daniel PM, Greenfield JG. Subacute cortical cerebellar degeneration and its relation to carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1951; 14: 59-75
- 237 Shams'ili S, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, Hooijkaas H, van der Holt B, Vecht C, Sillevs Smitt P. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain* 2003; 126: 1409-18
- 238 Mason WP, Graus F, Lang B, Honnorat J, Delattre J-Y, Vallderiola F, Antoine JC, Rosenblum MK, Rosenfeld MR, Newsom-Davis J, Posner JB, Dalmau J. Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Brain* 1997; 120: 1279-1300
- 239 Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody positive patients. *Neurology* 1992; 42: 1931-1937
- 240 Bernal F, Shams'ili S, Rojas I, Sanchez-Valle R, Saiz A., Dalmau J, Honnorat J, Sillevs Smitt P, Graus F. Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Neurology* 2003; 60: 230-234
- 241 Bataller L, Wade D, Graus F, Stacey BS, Rosenfeld MR, Dalmau J. Antibodies to Zic4 in paraneoplastic neurologic disorders and small-cell lung cancer. *Neurology* 2004; 62: 778-782
- 242 Graus F, Illa I, Agusti M, Ribalta T, Cruz-Sanchez F, Juarez C. Effect of intraventricular injection of an anti-Purkinje cell antibody (anti-Yo) in a guinea pig model. *J Neurol Sci* 1991; 106: 82-87
- 243 Yoshimi K, Woo M, Son Y, Baudry M, Thompson RF. IgG immunostaining in the intact rabbit brain: variable but significant staining of hippocampal and cerebellar neurons with anti-IgG. *Brain Res* 2002; 956: 53-66

-
- 244 Tanaka K, Ding X, Tanaka M. Effects of antineuronal antibodies from patients with paraneoplastic neurological syndrome on primary-cultured neurons. *J Neurol Sci* 2004; 217: 25-30
- 245 Fukuda T, Motomura M, Nakao Y, Shiraishi H, Yoshimura T, Iwanaga K, Tsujihata M, Eguchi K. Reduction of P/Q-type calcium channels in the post-mortem cerebellum of paraneoplastic cerebellar degeneration with Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 2003; 53: 21-8
- 246 Lawn ND, Westermoreland BF, Kiely MJ, Lennon VA, Vernino S. Clinical, magnetic resonance imaging, and electroencephalographic findings in paraneoplastic limbic encephalitis. *Mayo Clin Proc* 2003; 78: 1363-1368
- 247 Hart IK, Maddison P, Newsom-Davis J, Vincent A, Mills KR. Phenotypic variants of autoimmune peripheral nerve hyperexcitability. *Brain* 2002; 125: 1887-1895
- 248 Buckley C, Oger J, Clover L, Tuzun E, Carpenter K, Jackson M, Vincent A. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2001; 50:73-8
- 249 Barber PA, Anderson NE, Vincent A. Morvan's syndrome associated with voltage-gated K⁺ channel antibodies. *Neurology* 2000; 54: 771-772
- 250 Madrid A, Gil-Peralta A, Gil-Neciga E, Gonzalez J, Jarrin S. Morvan's fibrillary chorea: remission after plasmapheresis. *J Neurol* 1996; 243: 350-353
- 251 Dorfman LJ, Forno LS. Paraneoplastic encephalomyelitis. *Acta Neurol Scand* 1972; 48: 556-74

-
- 252 Wainwright MS, Martin PL, Morse RP, Lacaze M, Provenzale JM, Coleman RE, Morgan MA, Hulette C, Kurtzberg J, Bushnell C, Epstein L, Lewis DV. Human herpesvirus 6 limbic encephalitis after stem cell transplantation. *Ann Neurol* 2001; 50: 612-9
- 253 Alamowitch S, Graus F, Uchuya M, Reñé R, Bescansa E, Delattre JY. Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features. *Brain* 1997; 120: 923-8
- 254 Pittock SJ, Kryzer TJ, Lennon VA. Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann Neurol* 2004; 56:715-9
- 255 Sutton I, Winer J, Rowlands D, Dalmau J. Limbic encephalitis and antibodies to Ma2: a paraneoplastic presentation of breast cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69: 266-8
- 256 Chan KH, Vernino S, Lennon VA. ANNA -3 anti-neuronal nuclear antibody: marker of lung cancer-relates autoimmunity. *Ann Neurol* 2001; 50: 301-311
- 257 Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain* 2000; 123: 1481-94
- 258 Sutton IJ, Barnett MH, Watson JD, Eil JJ, Dalmau J. Paraneoplastic brainstem encephalitis and anti-Ri antibodies. *J Neurol* 2002; 249: 1597-8
- 259 Dorresteijn LD, Kappelle AC, Renier WO, Gijtenbeek JM. Anti-amphiphysin associated limbic-encephalitis: a paraneoplastic presentation of small-cell lung carcinoma. *J Neurol* 2002; 249: 1307-8
- 260 Newsom-Davis J, Buckley C, Clover L, Hart I, Maddison P, Tüzüm E, Vincent A. Autoimmune disorders of neuronal potassium channels. *Ann NY Acad Sci* 2003; 998: 202-210

-
- 261 Bataller L., Dalmau JO. Paraneoplastic disorders of the central nervous system: update on diagnostic criteria and treatment. *Seminars in Neurology* 2004; 24: 461-471
- 262 Graves TD, Hanna MG. Neurological channelopathies. *Postgrad Med J* 2005; 81: 20-32
- 263 Dalmau J, Gultekin HS, Posner JB. Paraneoplastic neurologic syndromes: pathogenesis and physiopathology. *Brain Pathol* 1999; 9: 275-284
- 264 Graus F, Dalmau J, Vallderiola F, Ferrer I, Rene R, Marin C, Vecht CJ, Arbizu T, Targa C, Moll JW. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol* 1997; 74: 55-61
- 265 Yamada K, Watanabe M. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int* 2002; 70: 94-108
- 266 O'Neill JH, Murray NM, Newsom-Davis J. The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. *Brain* 1988; 111: 577-596
- 267 Hart IK, Waters C, Vincent A, Newland C, Beeson D, Pongs O, Morris C, Newsom-Davis J. Autoantibodies detected to expressed K⁺ channels are implicated in neuromyotonia. *Ann Neurol* 1997; 41:238-246
- 268 Mullen RJ, Back CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992; 116: 201-211
- 269 Cunningham J, Graus F, Anderson N, Posner JB. Partial characterization of the Purkinje cell antigens in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neurology* 1986; 36: 1163-68

-
- 270 Bataller L, Sabater L, Saiz A, Serra C, Claramonte B, Graus F. Carbonic anhydrase-related protein VIII: autoantigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 2004; 56: 575-79
- 271 Alamowitch S, Graus F, Uchuya M, Rene R, Bescansa E, Delattre JY. Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features. *Brain* 1997; 120: 923-28
- 272 Rosenfeld M, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J. Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol* 2001; 50: 339-48
- 273 Lang B, Pinto A, Giovannini F, Newsom-Davis J, Vincent A. Pathogenic autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 998: 187-95
- 274 Iwasa K, Pinto A, Vincent A, Lang B. LEMS IgG binds to extracellular determinants on N-type voltage-gated calcium channels, but does not reduce VGCC expression. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 998: 196-9
- 275 Monstad SE, Drivsholm L, Storstein A, Aarseth JH, Haugen M, Lang B, Vincent A, Vedeler CA. Hu and voltage-gated calcium channel (VGCC) antibodies related to the prognosis of small cell-lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 795-800
- 276 Wirtz PW, Lang B, Graus F, van den Maagdenberg AM, Saiz A, de Koning Gans PA, Twijnstra A, Verschuuren JJ. P/Q type calcium channel antibodies, Lambert-Eaton myasthenic syndrome and survival in small cell lung cancer. *J Neuroimmunol* 2005; 164: 161-5
- 277 Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, O'Suilleabhain PE, Windebank AJ, Woppmann A, Miljanich GP, Lambert EH. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *N Engl J Med* 1995; 332: 1467-74

-
- 278 Pinto A, Gillard S, Moss F, Whyte K, Brust P, Williams M, Stauderman K, Harpold M, Lang B, Newsom-Daivs J, Bleakman D, Lodge D, Boot J. Human autoantibodies specific for the alpha1A calcium channel subunit reduce both P-type and Q-type calcium currents in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 8328-8333
- 279 Sakai K, Shirakawa T, Kitagawa Y, Yiyig L, Hirose G. Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen in vivo by DNA immunization. *J Autoimmun* 2001; 17: 297-302
- 280 Corsellis JA, Goldberg GJ, Norton AR. Limbic encephalitis and its association with carcinoma. *Brain* 1968; 91:481-96
- 281 Henson RA, Hoffman HL, Urich H. Encephalomyelitis with carcinoma. *Brain* 1965; 88:449-64
- 282 Graus F, Elkon KB, Cordon-Cardo C, Posner JB. Sensory neuronopathy and small cell lung cancer. Antineuronal antibody that also reacts with the tumor. *Am J Med* 1986; 80: 45-72
- 283 Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and yuxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 1993; 365: 75-9
- 284 Zhou L, Zhang CL, Messing A, Chiu SY. Temperature-sensitive neuromuscular transmission in Kv1.1 null mice: role of potassium channels under the myelin sheath in young nerves. *J Neurosci* 1998; 18: 7200-215
- 285 Johnston D, Hoffman DA, Magee JC, Poolos NP, Watanabe S, Colbert CM, Migliore M. Dendritic potassium channels in hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol* 2000; 525: 75-81
- 286 McNamara JO, Whitney KD, Andrews PI, He XP, Janupalli S, Patel MN. Evidence for glutamate receptor autoimmunity in the pathogenesis of Rasmussen's encephalitis. *Adv Neurol* 1999; 79: 543-50

-
- 287 Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, Clover L, Parkinson A, Bien CG, Omer S, Lang B, Rossor MN, Palace J. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 2004; 127: 701-712
- 288 Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, Liebeskind DS, Voloschin A, Houghton DJ, Gaketta SL, Dichter M, Alavi A, Rosenfeld MR, Dalmau J. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain* 2005; 128: 1764-1777
- 289 Dalmau J, Tüzün E, Wu H, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, Baehring JM, Shimazaki H, Koide R, King D, Mason W, Sansing LH, Dichter MA, Rosenfeld MR, Lynch DR. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 2007; 61: 25-36
- 290 Lapteva L, Nowak M, Yarboro CH, Takada K, Roebuck-Spencer T, Weickert T, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies, cognitive dysfunction, and depression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2505-2514
- 291 Kowal C, Degiorgio LA, Lee JY, Edgar MA, Huerta PT, Volpe BT, Diamond B. Human lupus autoantibodies against NMDA mediate cognitive impairment. *PNAS* 2006; 103: 19854-9
- 292 Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006; 66: 1485-1489
- 293 Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004; 364: 2106-2112
- 294 Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corcoy JR, Lennon VA. Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. *Arch Neurol* 2006; 63: 964-968

-
- 295 Pittock SJ, Lennon VA, Krecke K, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 2006; 63:390-396
- 296 Dropcho EJ, Stanton C, Oh SJ. Neuronal antinuclear antibodies in a patient with Lambert-Eaton myasthenic syndrome and small-cell lung carcinoma. *Neurology* 1989; 39: 249-251
- 297 Lucchinetti CF, Kimmel DW, Lennon VA. Paraneoplastic and oncologic profiles of patients seropositive for type 1 antineuronal nuclear antibodies. *Neurology* 1998; 50: 652-657
- 298 Sabater L, Saiz A, Titulaer MJ, Verschuuren JJ, Graus F. SOX1 antibodies are markers of paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology (Abstract)* 2007; 68 (Suppl 1): A290

I. Anexos

Trabajo 1: Estudio de la incidencia de los canales de calcio tipo P/Q en la degeneración cerebelosa paraneoplásica asociada al cáncer de pulmón.

Trabajo 2: Estudio de los anticuerpos contra canales de potasio presentes en pacientes con una encefalitis límbica.

Trabajo 3: El uso de un anticuerpo nuclear anti-glial como probable marcador del cáncer de pulmón y como ayuda para el diagnóstico de los síndromes neurológicos paraneoplásicos.

Trabajo 1: Estudio de la incidencia de los canales de calcio tipo P/Q en la degeneración cerebelosa paraneoplásica asociada al cáncer de pulmón.

Este trabajo, se inició para evaluar la importancia de los anticuerpos contra canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) tipo P/Q en un grupo de pacientes con degeneración cerebelosa paraneoplásica (DCP) con cáncer de pulmón, intentando:

- comparar la presencia clínica o electrofisiológica de síndrome de Eaton-Lambert (SMEL),
- las diferencias en el pronóstico clínico de pacientes con o sin anticuerpos contra VGCC y,
- evaluando la posibilidad de una síntesis intratecal de anticuerpos contra VGCC

El estudio de estos anticuerpos contra VGCC se realizó tras la evidencia de que en casos con DCP y cáncer de pulmón no siempre se detectan los anticuerpos antineuronales tipo Hu, u otros. Periféricamente, los anticuerpos contra VGCC se encuentran en el SMEL, aunque si pudiesen acceder al SNC podrían estar implicados en la fisiopatogenia de la DCP.

La participación de este doctorando en este estudio fue de revisar las historias clínicas recogidas a lo largo de años en el Hospital Clínic, controlando si se tenía toda la información necesaria. En caso contrario, nos poníamos en contacto con los médicos responsables del paciente o incluso con el propio paciente y/o familiares para evaluar el pronóstico clínico del mismo. Luego participe en la escritura y revisión del artículo publicado.

Fue presentado como póster en la 127^a Reunión de la Academia Americana de Neurología (ANA) en Nueva York, NY, U.S.A, en Octubre 2002. Fui premiada con una de las 3 becas otorgadas para atender al congreso de entre más de 300 abstracts seleccionados.

but has been estimated to occur in 1:60,000 to 100,000 patients with cancer and has been found most frequently in renal carcinoma, neuroblastoma, and malignant melanoma.¹⁰

Patients presenting with a regressing cerebral mass lesion are diverse with ages ranging between 8 and 76, both solitary and multiple lesions, and localization throughout the brain. Within this population the differential diagnosis is broad. However, patients with PCNL tend to be older, and recurrence is most likely within 18 months: median duration of remission is 7 months with a range of 1 to 54 months. Clinical and radiologic features cannot definitively distinguish PCNL from non-PCNL patients. Even CR of the enhancing lesion does not confer diagnostic certainty, because one of six patients with a CR proved to harbor a PCNL. However, prognosis is generally better in patients showing CR than in those with PR, regardless of the ultimate diagnosis.

Acknowledgment

The authors thank G.J.E. Rinkel, MD, for his valuable comments on an earlier version of the manuscript.

References

1. Alderson L, Fetell MR, Sisti M, Hochberg F, Cohen M, Louis DN. Sentinel lesions of primary CNS lymphoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:102-105.
2. Singh A, Strobos RJ, Singh BM, et al. Steroid-induced remissions in CNS lymphoma. *Neurology* 1982;32:1267-1271.
3. Kepes JJ. Large focal tumor-like demyelinating lesions of the brain: intermediate entity between multiple sclerosis and acute disseminated encephalomyelitis? A study of 31 patients. *Ann Neurol* 1993;33:18-27.
4. Gizzi MS, Lidov M, Rosenbaum D. Neurosarcoidosis presenting as a tumour of the basal ganglia and brainstem: sequential MRI. *Neurol Res* 1993;15:93-96.
5. Watling CJ, Lee DH, Macdonald DR, Cairncross JG. Corticosteroid-induced magnetic resonance imaging changes in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 1994;12:1886-1889.
6. DeAngelis LM. Primary central nervous system lymphoma. *Curr Opin Neurol* 1999;12:687-691.
7. Youl BD, Kermodie AG, Thompson AJ, et al. Destructive lesions in demyelinating disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:288-292.
8. DeAngelis LM. Primary central nervous system lymphoma imitates multiple sclerosis. *J Neurooncol* 1990;9:177-181.
9. Heimans JJ, De Visser M, Polman CH, Nauta J, Kamphorst W, Troost D. Accuracy and interobserver variation in the interpretation of computed tomography in solitary brain lesions. *Arch Neurol* 1990;47:520-523.
10. Cole WH. Efforts to explain spontaneous regression of cancer. *J Surg Oncol* 1981;17:201-209.

P/Q type calcium-channel antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration with lung cancer

Abstract—Raised levels of P/Q type voltage-gated calcium-channel (VGCC) antibodies were found in 16 (41%) of 39 patients with paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD) and Hu antibodies were found in nine (23%). Seven of the 16 VGCC antibody-positive patients had Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS). Seven of 15 CSF samples had VGCC antibodies, with evidence of intrathecal synthesis in four. VGCC antibodies should be looked for in PCD, even if there are no symptoms of LEMS, and may be related to the cerebellar dysfunction.

NEUROLOGY 2002;59:764-766

F. Graus, MD; B. Lang, PhD; P. Pozo-Rosich, MD; A. Saiz, MD; R. Casamitjana, MD; and A. Vincent, FRCPATH

The pathologic hallmark of paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD) is subacute loss of Purkinje cells of the cerebellum.¹ In this and other paraneoplastic conditions, there are often serum and CSF antibodies to antigens that are expressed by the tumor and

also by the nervous system.¹ Patients with PCD and small cell lung carcinoma (SCLC) may have Hu antibodies in serum and CSF, particularly if there is clinical evidence of neurologic symptoms beyond the cerebellum.² However, in a substantial number of patients with PCD and SCLC, Hu or other antineuronal antibodies are not detected, but antibodies to P/Q type voltage-gated calcium channels (VGCC) have been reported in some cases.^{2,8} VGCC antibodies are typically associated with the Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS), but not all patients with PCD and VGCC antibodies had clinical evidence of LEMS. VGCC antibodies, in contrast to Hu antibodies, bind to extracellular determinants and alter VGCC expression, and if they are able to access the CNS they could theoretically be directly responsible for the cerebellar dysfunction in PCD.⁴

From the Services of Neurology (Drs. Graus, Pozo-Rosich, and Saiz) and Hormonal Laboratory (Dr. Casamitjana), Hospital Clinic, Universitat de Barcelona and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; and Neurosciences Group (Drs. Lang and Vincent), Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, United Kingdom.

Supported in part by grant SGR 9500027 Generalitat de Catalunya, Spain (F.G.).

Received February 20, 2002. Accepted in final form May 3, 2002. Address correspondence and reprint requests to Dr. Francesc Graus, Servei de Neurologia, Hospital Clinic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain; e-mail: graus@medicina.ub.es

764 Copyright © 2002 by AAN Enterprises, Inc.

To clarify the clinical and pathologic relevance of P/Q type VGCC antibodies, we reviewed 39 patients with PCD and lung cancer and looked for clinical and electrophysiological evidence of LEMS. We compared the prognosis in VGCC antibody-positive and -negative cases and assessed intrathecal synthesis of VGCC antibodies.

Patients and methods. From our database, we selected patients with the final diagnosis of PCD with lung cancer. These patients presented with an isolated or clearly predominant cerebellar syndrome of unknown cause and had either Hu antibodies or developed lung cancer. Unlike previous work,² we specifically excluded Hu-positive patients who presented with ataxia but quickly developed symptoms beyond the cerebellum; the purpose was to exclude cases of paraneoplastic encephalomyelitis that, in contrast to PCD, almost always have Hu antibodies.¹ All patients were tested retrospectively for VGCC antibodies, and the clinical features were compared between antibody-positive and -negative patients (table).

Serum and CSF, when available, were evaluated for the presence of antineuronal antibodies by immunohistochemistry on frozen sections of rat cerebellum according to standardized techniques previously reported in detail.⁸ Antibodies to P/Q type VGCC were analyzed in the Oxford laboratory, as previously described,⁶ using ¹²⁵I- α -CmTx-VGCC extracted from human cerebellum. Sera, diluted 1:10, were screened using 2.5 μ L, and all positive samples were titrated for accurate determination. CSF samples were screened using 50 μ L of undiluted CSF (with 2.5 μ L normal human serum as carrier) and diluted further if necessary. CSF results were considered positive if greater than the mean \pm 3 SD from 14 CSF from patients with degenerative ataxias. Intrathecal synthesis of VGCC antibodies was calculated in paired samples of serum and CSF by the formula:

$$\frac{\text{CSF titer (pM/mg CSF IgG:Serum titer (pM/mg serum IgG))}}{\text{CSF total IgG:Serum total IgG}}$$

A value higher than 1 was considered indicative of intrathecal synthesis.

Results. Thirty-nine patients (37 men, 2 women) fulfilled the criteria of PCD and had a median age of 63 years. SCLC was diagnosed in 31 patients and other types of lung cancer in five. One patient had x-ray features suggestive of lung cancer, but histology could not be obtained. Two patients with no evidence of tumor were included because they were smokers and had Hu antibodies.

Only eight (20.5%) patients had clinical features consistent with LEMS (see table). One patient was VGCC antibody-negative at the time of diagnosis of ataxia, and 2 years later he developed electromyographic (EMG) features of LEMS (serum was not available at this time). In the other seven patients, LEMS was present at the first neurologic evaluation. An EMG was also performed in the nine patients with positive VGCC antibodies without clinical evidence of LEMS and was negative in all of them. EMG was done specifically to rule out LEMS in five of the nine patients. In the other four, the EMG repetitive stimulation was not done, but the compound muscle action potential was reported to be of normal amplitude.

Serum VGCC antibodies were identified in 16 (41%)

Table Association between clinical characteristics and the presence of anti-VGCC antibodies in 39 patients with PCD

Characteristic	Anti-VGCC positive (n = 16)	Anti-VGCC negative (n = 23)	p Value
Median age, y	63	63	NS
Sex			
Male	16	21	NS
Female	0	2	
Hu antibodies			
Positive	2	7	NS
Negative	14	16	
Clinical evidence of LEMS			
Yes	7	1*	0.004
No	9	22	
Rankin score at diagnosis			
1-3	7	9	NS
4-5	8	13	
Unknown	1	1	
Median time between PCD and tumor diagnosis, mo	3	3	NS
Tumor type			
SCLC†	13	18	NS
non-SCLC†	2	3	
X-ray†	1	0	
No cancer†	0	2	
Treatment of PCD			
Tumor treatment \pm immunotherapy	9	9	NS
Immunotherapy	4	2	
None	3	11	
Unknown	0	1	
PCD outcome			
Better (improvement \geq 1 point in Rankin score)	1	3†	NS
Stable (Rankin \leq 3, follow-up > 6 mo)	5	3	
Other (worse or stable with Rankin >3)	5	3	
Unknown/not applicable	5	14	
Median survival, mo	12	10	NS

* Serum tested when patient did not have clinical evidence of LEMS.

† Two of the three patients were anti-Hu-positive.

VGCC = voltage-gated calcium channel; PCD = paraneoplastic cerebellar degeneration; LEMS = Lambert-Eaton myasthenic syndrome; SCLC = small cell lung carcinoma.

patients (median of positive titers 648 pM/L; figure). No major differences were observed between patients with and without VGCC antibodies except for the higher occurrence of LEMS in the positive group (see table). In the three patients with both PCD and LEMS who underwent

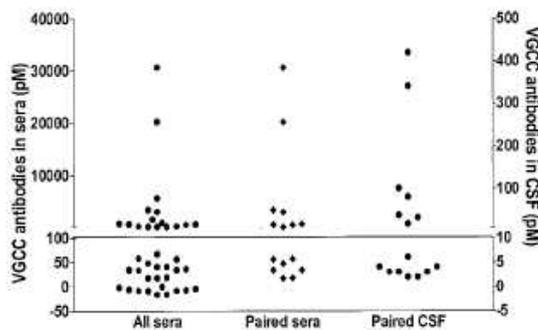


Figure. Voltage-gated calcium channel (VGCC) antibody levels in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and lung cancer. The serum values relate to the left vertical axis and the CSF values to the right vertical axis.

immunotherapy, there was improvement in the LEMS without any apparent beneficial effect on PCD.

Paired serum/CSF samples were available in 15 patients. Positive CSF VGCC antibodies were found in seven (47%) of these, with a median titer of 81 pM/L (see figure). Measurement of CSF:serum VGCC antibody/IgG ratios was performed in these seven patients; four had values >1 (range, 1.5 to 4.8), compatible with intrathecal synthesis of the antibody.

Discussion. VGCC antibodies were present in 41% of patients tested, including those without clinical or EMG features of LEMS, and were more frequent than Hu antibodies. This indicates that VGCC antibodies provide a more useful marker for PCD associated with lung cancer than Hu antibodies. Moreover, VGCC antibodies were found in the CSF and there was some evidence of intrathecal synthesis; thus they could well play a pathogenic role in the evolution of the disease.

The frequency of P/Q type VGCC antibodies in patients with particular paraneoplastic neurologic disorders is not clear. An initial study found low titers of VGCC antibodies in 40% of 70 patients with different types of paraneoplastic neurologic disorders.⁷ By contrast, other studies suggest that VGCC antibodies are found only in patients with either LEMS or PCD with SCLC and in some of those with paraneoplastic encephalomyelitis and Hu antibodies.^{2,8} In the latter group, the incidence of VGCC antibodies is less than 13%,^{2,8} whereas in patients with PCD and lung cancer without Hu antibodies, the frequency of VGCC antibodies in the current and previous study² was higher than 36%. Therefore, VGCC antibodies represent the most useful antibody as a marker of lung cancer associated with PCD. Because some of the patients with VGCC antibodies did not have either clinical or EMG evidence of LEMS, this antibody should be looked for regardless of the presence of LEMS.

VGCC antibodies are known to be pathogenic in LEMS.⁸ The absence of LEMS in some PCD patients with high titers of VGCC antibodies is, therefore,

surprising. It may be that the specificity of the antibodies differs from those in patients with typical LEMS; for instance, it is possible that the antibodies bind to intracellular epitopes that are not expressed on the cell surface. This will require further investigation. Alternatively, the motor nerve terminal may be able to upregulate other subtypes of VGCC to overcome the peripheral dysfunction. Some evidence of modulation of VGCC expression has already been demonstrated in model systems.⁹

Finally, our results suggest that the VGCC antibodies can gain access to the CNS and could, therefore, bind to the P type VGCC on Purkinje cells.⁴ Conversely, we failed to show a better response to treatment in antibody-positive patients, and, as described in a previous report,¹⁰ PCD did not improve in our patients whose LEMS got better after treatment. It may be that the Purkinje cells have already been irreversibly damaged by the VGCC antibodies or that the immunotherapies used were unable to remove the antibodies from the CSF. We cannot exclude the presence of other coexisting immune mechanisms, e.g., cytotoxic T cells, that are responsible for the cerebellar dysfunction and that the VGCC antibodies, like Hu antibodies, are a secondary marker.

Acknowledgment

The authors thank all the neurologists who provided clinical information of their patients.

References

1. Dalmau J, Gultekin HS, Posner JB. Paraneoplastic neurologic syndromes: pathogenesis and physiopathology. *Brain Pathol* 1999;9:275-284.
2. Mason WP, Graus F, Lang B, et al. Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Brain* 1997;120:1279-1300.
3. Voltz RA, Carpentier AF, Rosenfeld MR, Posner JB, Dalmau J. P/Q type voltage-gated calcium channel antibodies in paraneoplastic disorders of the central nervous system. *Muscle Nerve* 1999;22:119-122.
4. Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M, Llinás RR. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7076-7080.
5. Graus F, Dalmau J, Vallderiola F, et al. Immunological characterization of a neural antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol* 1997;74:55-61.
6. Motomura M, Johnston I, Lang B, Vincent A, Newsom-Davis J. An improved diagnostic assay for Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58:85-87.
7. Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, et al. Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *N Engl J Med* 1995;332:1467-1474.
8. Lang B, Newsom-Davis J. Immunopathology of the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Springer Semin Immunopathol* 1995;17:3-15.
9. Pinto A, Gillard S, Moss F, et al. Human autoantibodies specific for the alpha1A calcium channel subunit reduce both P-type and Q-type calcium currents in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8328-8333.
10. Blumenfeld AM, Recht LD, Chad DA, DeGiorlami U, Griffin T, Jeackle KA. Coexistence of Lambert-Eaton myasthenic syndrome and subacute cerebellar degeneration: differential effects of treatment. *Neurology* 1991;41:1682-1685.

Anexo II

Trabajo 2: Estudio de los anticuerpos contra canales de potasio presentes en pacientes con una encefalitis límbica.

Este trabajo, fue pensado para comparar los casos de encefalitis límbica en los que se conocía la presencia de una neoplasia, a la que se le atribuía ser la causante de la encefalitis y, aquellos casos idiopáticos. Hasta un 50% de los pacientes con encefalitis límbica y cáncer de pulmón de célula pequeña tienen anticuerpos anti-Hu. El resto de pacientes, aquellos sin anticuerpos anti-Hu no desarrollan síntomas fuera del sistema límbico y mejoran con tratamiento contra el cáncer. Estudiamos la presencia en suero y líquido cefalorraquídeo de anticuerpos contra VGKC.

Con esto los objetivos eran de establecer si la presencia de anticuerpos contra VGKC estaba asociada a:

- características clínicas determinadas
- una respuesta concreta al tratamiento con inmunosupresores.

La participación de este doctorando en este estudio fue de revisar las historias clínicas recogidas a lo largo de años en el Hospital Clínic, asegurándose que se tuviese toda la información necesaria. En caso contrario, nos poníamos en contacto con los médicos responsables del paciente o incluso con el propio paciente y/o familiares para evaluar el pronóstico clínico del mismo. Participando más tarde, en el análisis de los anticuerpos contra VGKC. Aprendiendo y realizando la técnica en el laboratorio de la Dra. Vincent en la Universidad de Oxford, con la ayuda de Linda Clover. Escribiendo, finalmente, el artículo de forma conjunta, utilizando los datos clínicos y hallazgos básicos.

Fue presentado como comunicación oral en la 13^a Reunión de la Sociedad Europea de Neurología en Istanbul, Turquía, en Junio 2003. Recibí una beca de viaje para atender el Congreso de la Sociedad Europea de Neurología (ENS).

2. M63V is completely conserved among mammals, and it can be found down the evolution scale until invertebrates such as *Drosophila melanogaster*, although it is not conserved among lower eukaryotes and prokaryotes. This significant degree of conservation of M63 suggests that its substitution by valine may lead to impairment of complex I activity.
3. The mutation was not present in a large series of 150 individuals from the same genetic background.
4. Biochemical studies in muscle and in a trans-mitochondrial cell line harboring homoplasmic levels of mutant mtDNA showed a specific alteration of complex I activity establishing a link between the mutation and the biochemical phenotype.

These findings suggest that mitochondrial ND genes should be studied in patients with maternally inherited or sporadic BSN and dystonia, particularly if complex I deficiency is demonstrated.

This study was supported by grants from the Diputación General de Aragón (P032-2000, J.M.), Spanish Minister of Health (FIS 00/0797, A.L.A.), and Spanish Network for Mitochondrial Disorders (G03-011, A.L.A., J.M.) and a fellowship from the Mexican Government (CONACYT-121963, A.S.).

References

1. DiMauro S. Lessons from mitochondrial DNA mutations. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:397–405.
2. De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, et al. Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene. *Pediatr Neurol* 1995;13:242–246.
3. Kirby DM, Kahler SG, Freckmann ML, et al. Leigh disease caused by the mitochondrial DNA G14459A mutation in unrelated families. *Ann Neurol* 2000;48:102–104.
4. Rieder MJ, Taylor SL, Tobe V, Nickerson DA. Automatic identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 1998;26:967–973.
5. Andreu AL, Tanji K, Bruno C, et al. Exercise intolerance due to a nonsense mutation in the mtDNA ND4 gene. *Ann Neurol* 1999;45:820–823.
6. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246:500–503.
7. Sue CM, Quigley A, Katsabani S, et al. Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. *J Neurol Sci* 1998;161:36–39.
8. Valentino ML, Avoni P, Barboni P, et al. Mitochondrial nucleotide changes C14482G and C14482A in the ND6 gene are pathogenic for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol* 2002;51:774–778.
9. Carelli V, Ghelli A, Bucchi L, et al. Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol* 1999;45:320–328.
10. Benecke R, Strumper P, Weiss H. Electron transfer complex I defect in idiopathic dystonia. *Ann Neurol* 1992;32:683–686.
11. Tabrizi SJ, Cooper JM, Shapira AHV. Mitochondrial DNA in focal dystonia: a cybrid analysis. *Ann Neurol* 1998;44:258–261.
12. Funalot B, Reyner P, Vighetto A, et al. Leigh-like encephalopathy complicating Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol* 2002;52:374–377.
13. Thyagarajan D, Shanske S, Vazquez-Memije M, et al. A novel mitochondrial ATPase 6 mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol* 1995;38:468–472.

Voltage-Gated Potassium Channel Antibodies in Limbic Encephalitis

Patricia Pozo-Rosich, MD,^{1,2} Linda Clover, BSc,¹ Albert Saiz, MD,² Angela Vincent, FRCPATH,¹ and Francesc Graus, MD²

We found voltage-gated potassium channel (VGKC) antibodies in 4 of 15 patients with limbic encephalitis (LE). Two patients with idiopathic LE had high VGKC antibody levels (>800pM; controls <100pM), that fell in parallel with a clinical response to immunotherapy. Two patients with lower VGKC antibodies (170pM, 300pM) had lung cancer (radiological evidence only in one) and the LE improved with immunotherapy in one. The other 11 patients without VGKC antibodies had paraneoplastic LE and eight onconeural antibodies (Hu in 6; Ma2 in 2). VGKC antibodies do not unambiguously discriminate between idiopathic or paraneoplastic LE but probably indicate a good response to immunotherapy.

Ann Neurol 2003;54:530–533

Limbic encephalitis (LE) is a paraneoplastic neurological syndrome often associated with small cell lung carcinoma (SCLC) and more rarely with testicular, breast, and other tumors (reviewed by Gultekin and colleagues¹). LE causes short-term memory loss, seizures, confusion, and behavioral changes. The magnetic reso-

From the ¹Neurosciences Group, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom; and ²Service of Neurology, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain.

Received Mar 31, 2003, and in revised form May 9 and Jun 16. Accepted for publication Jun 16, 2003.

Address correspondence to Dr Graus, Servei de Neurologia, Hospital Clinic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. E-mail: graus@medicina.ub.es

nance imaging (MRI) scan usually shows hyperintense T2 lesions that involve both hippocampus and amygdala and reflect the pathological changes of inflammatory infiltrates and neuronal loss found at postmortem.^{1,2} As in other paraneoplastic neurological syndromes, LE occasionally has been observed in patients without cancer even after many years of follow-up.^{3,4}

Up to 50% of patients with LE and SCLC have Hu antibodies.⁵ Hu antibody-negative LE patients usually do not develop symptoms beyond the limbic system and appear to improve more often after treatment of the cancer than those who have Hu antibodies,⁵ suggesting that the pathogenesis of the LE in both groups could be different. Recently, antibodies to voltage-gated potassium channels (VGKCs), that probably play a pathogenic role in neuromyotonia,^{6,7} were described in three patients with LE, two of them without tumor and one associated with thymoma. Neurological symptoms improved contemporaneous with a reduction in the VGKC antibody levels.^{8,9}

This observation lead us to analyze the presence of VGKC antibodies in a series of paraneoplastic and idiopathic LE patients to determine whether these antibodies are frequent, and associated with particular clinical features or response to immunosuppressive treatment.

Patients and Methods

We selected patients from those whose serum was sent to one of us (F.G.) for the detection of onconeural antibodies, and who met the following diagnostic criteria: subacute onset, in days or weeks, of severe short-term memory loss, seizures or behavioral changes, abnormal MRI with bilateral, usually asymmetric, noncontrast enhancing, hyperintense T2 lesions in the hippocampus, amygdala, or other areas of the limbic system, and exclusion of other potentially confusing diagnosis. LE was considered paraneoplastic if a tumor was diagnosed in the follow-up period or if the onconeural antibodies were positive. Idiopathic LE was defined as the absence of onconeural antibodies and no evidence of tumor after at least 3 years.

Serum and cerebrospinal fluid (CSF), when available, were evaluated for the presence of onconeural antibodies by immunohistochemistry on frozen sections of rat cerebellum according to standardized techniques previously reported.¹⁰ Antibodies to VGKC were analyzed as previously described^{6,7} using ¹²⁵I- α -dendrotoxin-VGKC extracted from rabbit cortex. Serum or CSF samples were screened, blind to the clinical details, and all positive samples were titrated for accurate determination. The results were the mean values of two independent determinations. Cutoff values were 100pM for serum and 10pM for CSF.

Results

We identified 15 patients with LE (Table). Patients usually presented short-term memory loss and other cognitive or psychiatric symptoms. Seizures occurred in

nine and was the only symptom in one (Patient 13, see Table, previously reported⁵). In one of the anti-Ma2-positive patients (Patient 14, see Table), the predominant clinical symptoms reflected the involvement of upper brainstem and diencephalon.¹¹

VGKC antibodies were detected in four patients. Two patients had idiopathic LE with no tumor diagnosed after 5 and 3 years and showed the highest levels of VGKC antibodies (992 and 810pM) with CSF VGKC antibody values of 69 and 52pM, respectively. Both patients had clinical and MRI resolution of the LE after three monthly cycles of intravenous immunoglobulin (IVIG) (0.4gm/day \times 5 days and methylprednisolone (1gm/day \times 3 days). After initial improvement, they received five bimonthly cycles of IVIG at 50% of the initial dose. At the end of these treatments, neuropsychological studies showed mild short-term memory loss that did not interfere with normal life. LE did not relapse and serum VGKC antibody determination was negative in the first patient and 474pM in the second. CSF follow-up samples were not obtained.

The other two VGKC-positive patients had paraneoplastic LE without onconeural antibodies. VGKC antibody levels were 170 and 300pM, respectively (CSF samples were not available). The first patient had SCLC that did not respond to chemotherapy. He had a partial response of the LE after a single cycle of IVIG and steroids, but 6 months later he had a clinical relapse of the LE with enlargement of the MRI lesions at the time of cancer progression. He made a remarkable improvement again after treatment with pulses of methylprednisolone (1gm/day \times 5 days) which he continues to receive. The VGKC antibodies were positive at the second relapse (118pM), but no samples were available at the time of the remission. The second patient had a probable paraneoplastic LE. He showed an increased tracer uptake in the mediastinum in the positron emission tomography scan that was not histologically confirmed. He was treated with IVIG and steroids without benefit, and he remained with severe memory deficits and high VGKC antibody levels (539pM) 22 months later. Tumor progression has not been confirmed.

The other 11 patients, who were all negative for VGKC antibodies, had paraneoplastic LE defined by the presence of Hu antibodies and cancer in five patients, Hu antibodies without cancer in one, and Ma2 antibodies and testicular cancer in two. Three patients had lung cancer without onconeural antibodies (see Table). Clinical improvement was not observed in paraneoplastic LE patients without VGKC antibodies except in the two patients with anti-Ma2 antibodies who responded to IVIG as reported in previous series.¹¹ In both patients, the anti-Ma2 titers remained elevated despite clinical improvement.

Table. Clinical and Immunological Characteristics of 15 Patients with LE

Patient	Age/Sex	Diagnosis	Clinical Features	Cancer	Antibody	Treatment	Outcome	Survival (mo)
1	50/M	Idiopathic	Short-term memory loss, confusion, psychomotor seizures	No	VGKC (810pM)	IVIg + steroids	Complete remission	+60
2	65/M	Idiopathic	Short-term memory loss, confusion, psychomotor seizures	No	VGKC (992pM)	IVIg + steroids	Complete remission	+36
3	47/M	Paraneoplastic	Short-term memory loss, confusion, generalized seizures	SCLC	VGKC (170pM)	IVIg + steroids ^a	Relapsing-remitting	+10
4	67/M	Paraneoplastic ^b	Short-term memory loss, psychomotor seizures	Lung ^c	VGKC (300pM)	IVIg + steroids	No improvement	+22
5	69/M	Paraneoplastic	Short-term memory loss, generalized seizures	SCLC	None	None	Not evaluable	3
6	61/M	Paraneoplastic	Short-term memory loss, confusion	SCLC	None	None	No improvement	9
7	65/M	Paraneoplastic ^b	Short-term memory loss, confusion	Lung ^d	None	IVIg	No improvement	+15
8	74/M	Paraneoplastic	Short-term memory loss, confusion	None	Hu	None	Lost to follow-up	10
9	66/M	Paraneoplastic	Short-term memory loss, confusion, focal status epilepticus	SCLC	Hu	None	No improvement	5
10	50/M	Paraneoplastic	Confusion, ^e focal and generalized status epilepticus	SCLC	Hu	Steroids + cyclophosphamide	No improvement	9
11	50/M	Paraneoplastic	Short-term memory loss, confusion, focal status epilepticus	SCLC	Hu	None	Progression to PEM	4
12	49/M	Paraneoplastic	Confusion ^e	Prostate	Hu	None	Progression to PEM	2
13	60/M	Paraneoplastic	Isolated focal and generalized seizures	SCLC	Hu	Chemotherapy	LE stable	31
14	26/M	Paraneoplastic	Confusion, supranuclear vertical gaze paresis	Seminoma	Ma2	Chemotherapy + IVIg	Complete remission	+36
15	27/M	Paraneoplastic	Short-term memory loss, confusion	Seminoma	Ma2	IVIg + steroids	Partial remission	+15

^aSteroids alone at second relapse.

^bProbably paraneoplastic.

^cPositron emission tomography evidence only.

^dNon-SCLC diagnosed 5 years before LE.

^eThe presence of status epilepticus or severe confusion prevented a formal evaluation of short-term memory. Both patients died shortly after admission and autopsy confirmed the LE and tumor.

SCLC = small cell lung cancer; LE = limbic encephalitis; VGKC = voltage-gated potassium channel; IVIg = intravenous immune globulin; PEM = paraneoplastic encephalomyelitis.

Discussion

In this study, VGKC antibodies were observed in four patients with idiopathic or paraneoplastic LE. None of the paraneoplastic LE with onconeural antibodies had concomitant VGKC antibodies. Our data suggest that VGKC antibodies are relatively common in LE, are not always associated with cancer, and may predict a particular syndrome that responds to immunosuppressor therapies. Improvement after immunotherapy without treatment of the underlying tumor is rare in paraneoplastic LE associated with onconeural antibodies.¹ In the LE with VGKC antibodies, the clinical improvement appears to be associated with a substantial decrease in the antibody level, suggesting this type of LE may be antibody mediated.⁸ The remission of clinical symptoms after treatment implies that VGKC antibodies, if pathogenic, do not cause irreversible neuronal damage. In contrast, other probable antibody-mediated central nervous system disorders such as the paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antibodies to VGCC¹²⁻¹⁴ or to the metabotropic glutamate receptor type 1¹⁵ cause substantial neuronal loss.

Whether the antibody level predicts the response of the LE to the treatment is currently unclear. The high levels of VGKC antibodies found in LE patients com-

pared with those with neuromyotonia^{6,7} may be why these antibodies cross the blood-brain barrier, reach the hippocampus, and cause the LE. A value of 4,005pM was found in a recent patient who also responded to immunotherapy.⁹ Similarly, in stiff-person syndrome, a disorder caused by dysfunction of spinal GABAergic circuits that respond to IVIg, very high levels of glutamic acid decarboxylase (GAD) antibodies are present.¹⁶ However, the antibody level alone is unlikely to be sufficient to account for the clinical syndrome. Patients with polyendocrine syndromes may also have high titers of GAD antibodies and never develop a stiff-person syndrome,¹⁷ and VGCC antibody levels in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration are similar to those with LEMS.¹²

The two patients with less high VGKC antibodies had paraneoplastic LE and did not respond so well to the immunotherapy. It appears that presumed immune-mediated syndromes such as opsoclonus myoclonus¹⁸ or Lambert-Eaton myasthenic syndrome¹⁹ usually respond less well to immunological therapies when the syndrome is associated with cancer. In both clinical settings, effective treatment of the cancer is important to improve the neurological disorder. In our two patients, the treatment of the tumor failed in one case and was not given in the other, and this

therapeutic aspect may explain the worse response to the immunotherapy compared with patients with idiopathic LE.

An intriguing aspect is why patients with LE and VGKC antibodies do not present clinical features of neuromyotonia or involvement of other areas of the central nervous system where VGKCs are also expressed. VGKCs are formed of different subunits that are distributed in different proportions in the nervous system.²⁰ The antibodies bind strongly to Kv 1.1 and 1.2 subtypes of VGKC, which are expressed widely in the brain, particularly in the hippocampus.⁸ It may be that neurons of the hippocampus are more sensitive to effects of these antibodies or that the antibodies had an easier access to this area because the blood-brain barrier is more leaky there. Future postmortem studies and experimental models should clarify these issues.

In conclusion, our study supports the need to detect VGKC antibodies, along with onconeural antibodies, in patients with a clinical picture suggestive of LE. The presence of VGKC antibodies does not unambiguously discriminate between paraneoplastic or idiopathic LE but probably predicts a good response to immunotherapy. Currently, plasmapheresis, IVIG, steroids, or a combination of these treatments have proved effective. Larger studies are required to determine the frequency of these antibodies in idiopathic and paraneoplastic LE and the optimal treatment regimens.

This study was supported by a grant from Generalitat de Catalunya, Spain (2001SGR 00387, F.G.)

We thank all the neurologists who provided clinical information about their patients.

References

- Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, et al. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain* 2000;123:1481-1494.
- Dirr LY, Elster AD, Donofrio PD, Smith M. Evolution of brain MRI abnormalities in limbic encephalitis. *Neurology* 1990;40:1304-1306.
- Bien CG, Schulze-Bonhage A, Deckert M, et al. Limbic encephalitis not associated with neoplasm as a cause of temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2000;55:1823-1828.
- Mori M, Kuwabara S, Yoshiyama M, et al. Successful immune treatment for non-paraneoplastic limbic encephalitis. *J Neurol Sci* 2002;201:85-88.
- Alamowitch S, Graus F, Uchuya M, et al. Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features. *Brain* 1997;120:923-928.
- Shillito P, Molenaar PC, Vincent A, et al. Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K⁺ channels of peripheral nerves. *Ann Neurol* 1995;38:714-722.
- Hart IK, Waters C, Vincent A, et al. Autoantibodies detected to expressed K⁺ channels are implicated in neuromyotonia. *Ann Neurol* 1997;41:238-246.
- Buckley C, Oger J, Clover L, et al. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2001;50:73-78.
- Schott JM, Harkness K, Barnes J, et al. Amnesia, cerebral atrophy, and autoimmunity. *Lancet* 2003;361:1266.
- Graus F, Dalmau J, Vallderiola F, et al. Immunological characterization of a neural antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol* 1997;74:55-61.
- Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, et al. Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol* 2001;50:339-348.
- Mason WP, Graus F, Lang B, et al. Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Brain* 1997;120:1279-1300.
- Graus F, Lang B, Pozo-Rosich P, et al. P/Q type calcium-channel antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration with lung cancer. *Neurology* 2002;59:764-766.
- Fukuda T, Motomura M, Nakao Y, et al. Reduction of P/Q type calcium channels in the postmortem cerebellum of paraneoplastic cerebellar degeneration with Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 2003;53:21-28.
- Coesmans M, Sillevs Smitt P, Linden DJ, et al. Mechanisms underlying cerebellar motor deficits due to mGluR1-autoantibodies. *Ann Neurol* 2003;53:325-336.
- Dalakas MC, Fujii M, Li M, et al. High-dose intravenous immune globulin for stiff-person syndrome. *N Engl J Med* 2001;354:1870-1876.
- Honnorat J, Saiz A, Giometto B, et al. Cerebellar ataxia with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *Arch Neurol* 2001;58:225-230.
- Bataller L, Graus F, Saiz A, Vilchez JJ. Clinical outcome in adult onset idiopathic or paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *Brain* 2001;124:437-443.
- Chalk CH, Murray NMF, Newsom-Davis J, et al. Response of the Lambert-Eaton myasthenic syndrome to treatment of associated small-cell lung carcinoma. *Neurology* 1990;40:1552-1556.
- Rhodes K, Monaghan M, Barrezueta N, et al. Voltage-gated K⁺ channel β subunits: expression and distribution of Kv β 1 and Kv β 2 in adult rat brain. *J Neurosci* 1996;16:4846-4860.

Anexo III

Trabajo 3: El uso de un anticuerpo nuclear anti-gliar como probable marcador del cáncer de pulmón y como ayuda para el diagnóstico de los síndromes neurológicos paraneoplásicos.

La participación de este doctorando en este estudio fue la de ayudar a analizar, junto a Mercé Bonastre, los AGNA mediante técnicas de inmunohistoquímica, sin tomar parte en la realización de los inmunoblots, participando en la revisión de estos posteriormente. Así mismo, revisando las historias clínicas recogidas a lo largo de años en el Hospital Clínic, controlando si se tenía toda la información necesaria; participando más tarde en la revisión del artículo publicado.

Fue presentado como comunicación oral en la 14^a Reunión de la Sociedad Europea de Neurología en Barcelona, España, en Junio 2004. Recibió el Premio de la Sociedad Europea de Neurología (ENS); además de una beca de viaje para atender el 15^o Congreso de la ENS en Viena, Austria en Junio 2005.



Anti-glial nuclear antibody: Marker of lung cancer-related paraneoplastic neurological syndromes

F. Graus^{a,*}, A. Vincent^b, P. Pozo-Rosich^a, L. Sabater^a, A. Saiz^a, B. Lang^b, J. Dalmau^c

^aService of Neurology, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, and Institut d' Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Vilarroel 170, Barcelona 08036, Spain

^bNeurosciences Group, Weatherall Institute of Molecular Medicine (WIMM), University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom

^cDepartment of Neurology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

Received 29 January 2005; accepted 28 March 2005

Abstract

We describe a new antibody, called anti-glial nuclear antibody (AGNA), in patients with paraneoplastic neurological syndromes (PNS) and small-cell lung carcinoma (SCLC). AGNA was initially identified in 24 sera of our archives by immunohistochemistry on rat cerebellum. AGNA positive sera showed a characteristic nuclear staining of the Bergmann glia in the Purkinje cell layer. Immunoblots and probing a cerebellar expression library with AGNA sera did not identify the antigen. Twenty of the 24 patients with AGNA had PNS and all but two had lung cancer. AGNA was identified in 13/113 (11.5%) patients with SCLC compared with 0/122 with other types of cancer ($p < 0.0001$). The frequency of AGNA was not higher than expected for the presence of SCLC in the different PNS subtypes except in LEMS ($p = 0.0002$). AGNA was present in 13/30 (43%) of LEMS patients with SCLC, compared with 0/19 of LEMS patients without cancer ($p = 0.0006$). We conclude that the recognition of AGNA is helpful since this antibody is found in PNS associated with SCLC, particularly LEMS, in which other onconeural antibodies are absent.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Paraneoplastic neurological syndromes; Lung cancer; Autoantibody

1. Introduction

The detection of onconeural antibodies has been very useful in helping to define the paraneoplastic etiology of a given neurological syndrome. Onconeural antibodies are detected in many laboratories by screening of sera on frozen sections of rat or mouse cerebellum (Moll et al., 1995; Vincent et al., 1998). Positive immunoreactivities are usually confirmed by immunoblot of recombinant proteins or neuronal homogenates.

Sera from patients with small-cell lung carcinoma (SCLC), the most common tumor associated with para-

neoplastic neurological syndromes (PNS), sometimes harbor antibodies against neural antigens that have not previously been recognized as associated with PNS (Gure et al., 2000). When this happens, it is important first to establish whether the antibody is related to the presence of a specific type of cancer, and second to investigate whether the antibody is associated with a particular PNS. Even if the antibody is not directly related to the immune response that causes a PNS, it may indicate the presence of an underlying cancer undiagnosed at the time of the antibody determination.

Here we describe a new antibody specificity, and show that it is a marker for SCLC. This antibody may help in the diagnosis of SCLC-related PNS, particularly the Lambert–Eaton myasthenic syndrome (LEMS).

* Corresponding author. Tel.: +34 932275414; fax: +34 932275783.
E-mail address: fgraus@clinic.ub.es (F. Graus).

2. Methods

2.1. Patients

We retrieved from the archives of one of the investigators (FG) those samples which had shown immunoreactivity restricted to the nuclei of the Bergmann glia (Yamada and Watanabe, 2002) of the Purkinje cell layer and to subpopulations of glial cell nuclei in the white matter during routine immunohistochemistry of rat cerebellum to detect onconeural antibodies, as previously described (Fig. 1) (Graus et al., 1997). The reactivity was defined as anti-glial nuclear antibody (AGNA).

To define the clinical associations with AGNA, we studied the serum of 113 patients without PNS and SCLC, 122 with other cancer types, and 19 with idiopathic LEMS, defined by the absence of cancer after at least 3 years of follow-up (O'Neill et al., 1988). To ascertain the frequency of AGNA among different PNS associated with SCLC, we reviewed the presence of AGNA immunoreactivity in 30 patients with paraneoplastic LEMS, 27 with paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD), 10 with sensory neuropathy, 10 with opsoclonus, and 8 with limbic encephalitis. All these patients had definite SCLC, except six who had X-ray evidence only of lung cancer. None of the sera harbor anti-Hu, anti-Ri, anti-Zic4 (Bataller et al., 2004b) or other associated antibodies that could obscure the presence of AGNA immunoreactivity.

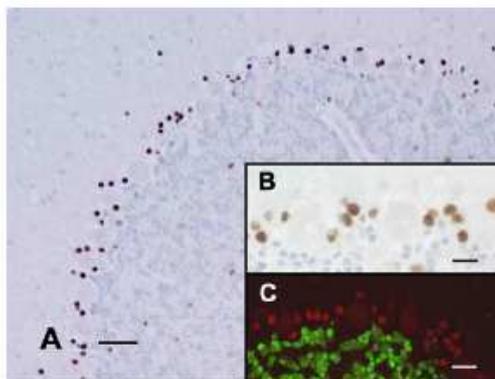


Fig. 1. (A) Frozen section of paraformaldehyde-fixed rat cerebellum immunoreacted with AGNA positive serum. There is intense labeling of the nuclei of Bergmann glia in the Purkinje cell layer. (B) Higher magnifications of the same section incubated with AGNA. (C) Double labeling study showing that AGNA reacts with the nuclei (red) of Bergmann glia, which are not labeled with NeuN a neuronal nucleus-specific monoclonal antibody (green). Note that NeuN labels the nuclei of granular cells and other cerebellar neurons except Purkinje cells, as previously described (Mullen et al., 1992). Bar=38 μ m (A), 18 μ m (B), and 24 μ m (C). Sections counterstained with hematoxylin in (A) and (B).

2.2. AGNA immunohistochemistry

AGNA immunoreactivity was analyzed by immunohistochemistry (serum screening dilution 1:500; biotinylated IgG from AGNA positive serum at 50 μ g/ml) using an avidin–biotin technique on paraformaldehyde-fixed frozen rat tissues or acetone-fixed human cerebellum as described previously (Graus et al., 1997). To show if AGNA of different patients recognized similar epitopes, rat cerebellar sections were pre-incubated with undiluted normal serum, an anti-Hu-positive serum, or AGNA-positive serum for 3 h followed by a biotinylated IgG obtained from a positive AGNA serum and developed with a standard avidin–biotin technique as described (Bernal et al., 2003). To study if there was AGNA immunoreactivity in samples of SCLC, paraffin sections were deparaffinised in xylene, rehydrated in alcohol, washed in tap water and heated for 2 min in a pressure cooking oven in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 6.0). After inhibition of endogenous peroxidase with 0.3% H_2O_2 , sections were sequentially incubated with undiluted normal human serum, biotinylated AGNA or control IgG in 10% normal human serum overnight at 4 $^{\circ}$ C, and developed with the avidin–biotin immunoperoxidase technique (Bernal et al., 2003).

For double-labeling experiments, frozen sections of rat brain were simultaneously incubated with a combination of NeuN (dilution 1:200) mouse monoclonal (Chemicon, Germany), a specific marker of neuronal nuclei (Mullen et al., 1992), and biotinylated AGNA IgG (1:50) overnight at 4 $^{\circ}$ C. Thereafter, sections were incubated with a combination of fluorescein-conjugated horse anti-mouse antibody (1:200) (Vector, Burlingame, CA) and rhodamine isothiocyanate-conjugated avidin (1:1000) (Sigma, St. Louis, MO) for 2 h at room temperature. Optical sections and digitally generated stereopairs were obtained using a Leica TCS 4D confocal laser-scanning microscope.

2.3. Western blot analysis

Proteins extracted from tissue homogenates of human cerebellar granule cells, frontal cortical neurons and white matter, rat cerebellum, and HeLa and LAN-1 neuroblastoma cell lines were separated by electrophoresis on a 4–12% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose paper and subjected to standard Western blot procedures using an avidin–biotin method as described (Cunningham et al., 1986; Saiz et al., 1997).

2.4. Screening of a cerebellar cDNA expression library

A Uni-ZAP XR Library (Stratagene, La Jolla, CA) from human cerebellum was immunoscreened with a pool of five AGNA sera (each diluted 1:1000) as previously reported (Bataller et al., 2004a). Several rounds of antibody screening were performed to reach a yield of 100% positive plaques. Phage clones were subcloned using the *in vivo*

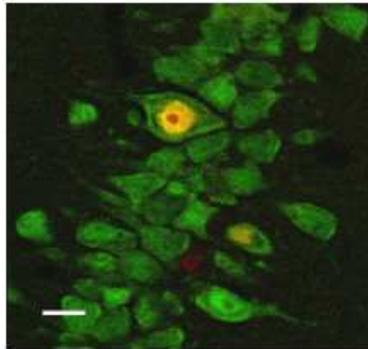


Fig. 2. Frozen section paraformaldehyde-fixed rat hippocampus double labeled with biotinylated AGNA IgG (red) and NeuN antibody (green). The nucleus of one neuron coexpress both antigens (yellow) whereas the nucleolus is only labeled with AGNA. Bar=11 μ m.

phage rescue protocol (Stratagene, La Jolla, CA) and sequenced.

To ascertain if positive clones were recognized by all five AGNA sera of the pool, we prepared nitrocellulose filters with mixed phage plaques (50% of plaques from positive clones and 50% from irrelevant clones). Filters were cut into strips and incubated with each of the five AGNA sera or control serum and developed by an avidin–biotin immunoperoxidase technique as described (Bataller et al., 2003).

3. Results

3.1. Diagnostic criteria of AGNA

By definition, AGNA was characterized by a highly restricted, and easily recognized, reactivity against the nuclei of Bergmann glia of the rat cerebellum (Fig. 1). Other cells of the cerebellum were negative except for isolated glial nuclei in the white matter. Double labeling experiments confirmed that the nuclei stained around the Purkinje cells were those of glial rather than neurons of the granular cell layer (Fig. 1). The antibody-binding pattern in rat cerebellum was abolished by preincubation with 16 (76.2%) of the 21 sera used in competitive inhibition experiments. AGNA immunoreactivity was also reproduced in mouse and human cerebellum.

3.2. Reactivity of AGNA in rat tissues and SCLC

In addition to the cerebellum immunoreactivity, AGNA labeled a subgroup of glial nuclei throughout the brain, ependymal cells, and satellite cells of dorsal root ganglia. Choroid plexus, endothelial cells and meninges were negative. AGNA positive isolated neuronal nuclei, defined by the nuclear size and shape of the cell and immune reaction with NeuN antibody, were observed in cortex,

hippocampus, basal ganglia, hypothalamus and upper brainstem (Fig. 2). In some neuronal groups in the basal forebrain and diencephalon, all nuclei were AGNA positive. Unlike adult rat brain, AGNA labeled the majority of neuronal nuclei in the brain of early (P1 to P3) postnatal rats. Systemic rat tissues (thymus, lung, heart, stomach, colon, liver, spleen, kidney, and testis) probed with biotinylated AGNA IgG were negative (data not shown). A SCLC from a patient without PNS incubated with the same antibody showed a strong immunoreactivity that was abolished with preincubation with an AGNA positive serum (Fig. 3).

3.3. Antigen analysis

Immunoblots of different tissue homogenates probed with several AGNA positive sera failed to produce a common band to identify AGNA more precisely. Screening of the cerebellar library produced 13 reactive clones coding for eight proteins. Only two of them were brain specific and localize in the nucleus and none was recognized by more than one AGNA serum.

3.4. Clinical and immunological associations of AGNA

AGNA was identified in 24 patients, 19 had SCLC, three had radiological evidence of lung cancer, and two had no cancer but one of them had LEMS with a follow-up of less than a year. Thus, detection of this antibody was highly predictive of a SCLC. Nine patients had LEMS, five PCD, one of them also with LEMS (Mason et al., 1997), three sensory neuronopathy, two limbic encephalitis, and one

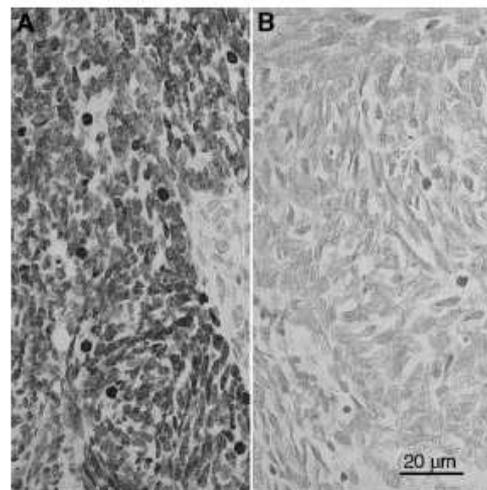


Fig. 3. Paraffin embedded sections of small-cell lung carcinoma (SCLC) immunoreacted with biotinylated AGNA IgG. The robust reactivity of the biotinylated AGNA IgG (A) is abolished by preincubation with an AGNA positive serum (B). Sections counterstained with hematoxylin.

sensorimotor neuropathy. Four patients did not have a PNS. Two of them had SCLC and one X-ray evidence of lung cancer; the final neurological diagnoses were chemotherapy-related sensory–neuropathy, diabetic neuropathy, and undefined encephalopathy in the setting of widespread, progressive, metastatic SCLC. The fourth patient had a slowly progressive dementia and rheumatoid arthritis with no evidence of cancer after 3 years of follow-up.

To analyze the presence of intrathecal synthesis, rat cerebellar sections were incubated with similar amounts of IgG from paired serum and CSF of five AGNA-positive patients (PCD: 2, LEMS: 2; non-PNS: 1). In four patients, AGNA reactivity was lost in the CSF at IgG concentrations higher than that of the paired serum. In the fifth patient, AGNA reactivity was lost at IgG concentrations that were half of the paired serum IgG concentration. These experiments suggested that intrathecal synthesis of AGNA was not a common feature in the population studied.

Due to the observed association with SCLC, we analyzed the presence of AGNA in sera from 113 patients without neurological disease and SCLC, and in 122 with other cancer types. AGNA was only detected in 13 (11.5%) patients all of them with SCLC ($p < 0.0001$). To ascertain if the frequency of AGNA in SCLC patients with PNS was higher than that observed in SCLC patients without neurological disorders, we reviewed the frequency of AGNA in patients with PNS and SCLC. The analysis was restricted to those who did not harbor other onconeural antibodies (Hu, Ri, Zic4) since their presence conceals AGNA immunoreactivity. The results are summarized in the table. Compared with the frequency of AGNA in patients with isolated SCLC, 23 (27%) of 85 patients who had SCLC associated with a variety of PNS had AGNA ($p = 0.009$). However, the higher frequency of AGNA in PNS was mainly due to the relative frequency of LEMS patients (see below), while other PNS patients showed a frequency of AGNA not different from that in patients with SCLC alone (see Table 1). Interestingly, all five

patients with PCD and AGNA also had voltage-gated calcium channel (VGCC) antibodies (Graus et al., 2002).

To ascertain if AGNA was linked to LEMS, rather than to an associated SCLC, we analyzed the presence of AGNA in 49 patients with LEMS with or without SCLC. Thirteen of the 30 (43%) LEMS patients with SCLC were positive for AGNA, whereas none of the 19 LEMS patients without cancer had AGNA ($p = 0.0006$).

4. Discussion

This study describes a new antibody, designated as AGNA, that may be helpful in the diagnosis of PNS associated with SCLC. Some PNS, like LEMS, are not associated with onconeural antibodies and may also occur in the absence of cancer. We show that AGNA is a good marker for the presence of an underlying SCLC and may help to identify which patients with clinical features of classical PNS (Graus et al., 2004), such as LEMS or PCD, without anti-Hu or other well-characterized onconeural antibodies, are at risk for the presence of a SCLC. However, the presence of AGNA alone cannot be considered as indication that the neurological syndrome under study is paraneoplastic because four (16.7%) of the 24 patients with AGNA had neurological diagnoses other than well-defined PNS (Graus et al., 2004).

AGNA produces a characteristic immunoreactivity in paraformaldehyde-fixed rat cerebellum but it was not detected by immunoblot. The negative immunoblot and unsuccessful attempt to define target antigen(s) using a cerebellar expression library suggest that the epitopes recognized by AGNA may be conformational, a finding also observed in anti-Tr antibodies of patients with PCD and Hodgkin disease (Graus et al., 1997). Until the identification of the AGNA antigen(s), which will allow the unambiguous diagnosis of this antibody, the very characteristic immunohistochemical pattern shown in Fig. 1 may be used to identify AGNA.

In order to determine that the immunohistochemical pattern defined by AGNA represented immune reaction with the same antigens we did an immunohistochemical competition assay in which 76.2% of AGNA sera completely abrogated the binding of biotinylated AGNA IgG to cerebellar sections. This finding indicates (1) that AGNA positive sera probably recognize the same antigens, but (2) they recognize more than one epitope, and (3) not all epitopes are recognized, at least with the same intensity, with all the AGNA sera. These data agree with those found in other onconeural antibodies such as anti-Hu (Manley et al., 1995; Graus et al., 1998).

The pattern of immunoreactivity of AGNA in newborn and adult rat brain has similarities with that of anti-CV2, also called CRMP5, antibodies observed in patients with various PNS and SCLC (Honnorat et al., 1996; Yu et al., 2001). Both antibodies recognize antigens which are widely

Table 1
Frequency of AGNA in patients with paraneoplastic neurological syndromes (PNS) and small-cell lung carcinoma (SCLC) without anti-Hu, Ri or Zic4 antibodies

Syndrome	Number of patients with PNS	AGNA (%)	p value ^a
LEMS ^b	30	13 (43.3)	0.0002
Cerebellar degeneration	27	5 (18.5)	0.34
Sensory neuropathy	10	3 (30.0)	0.12
Opsoclonus	10	0 (0.0)	0.60
Limbic encephalitis	8	2 (25.0)	0.26
Total PNS	85	23 (27.1)	0.009
No PNS	113	13 (11.5)	

^a All syndromes compared with the series of SCLC without neurological disease by the Fisher's exact test.

^b Paraneoplastic LEMS patients were collected from three laboratories (JD, FG, AV); all the other patients are from the Barcelona database only. Analysis remains statistically significant ($p = 0.01$) if only the 23 paraneoplastic LEMS patients (eight (35%) were AGNA positive) from the Barcelona database are analyzed.

expressed in the developing nervous system and then down regulated and expressed in the adult brain only in a subpopulation of glial cells, oligodendrocytes in the case of CV2 antibodies, and neurons. Other antigens that are preferentially expressed at developmental stages have been identified by serological analysis of expression cDNA libraries derived from SCLC, using sera of SCLC patients without PNS (Gure et al., 2000). Therefore, these developmentally regulated antigens seem highly immunogenic when expressed in SCLC and the triggered immune response may associate with PNS in some cases.

We could not ascertain the coincident expression of AGNA in SCLC patients with PNS and anti-Hu, Ri or Zic4 antibodies. This data will remain unknown until we can determine AGNA by more specific methods. Even if anti-Hu immunoreactivity, the most common antibody, is eliminated from the immunohistochemistry assay with preabsorption of sera with HuD, the high titers of anti-Hu antibodies usually required to absorb the sera at high dilutions where AGNA immunoreactivity may be lost. Despite this drawback, our data suggest that immunity against the AGNA antigen expressed in SCLC may not be relevant in the pathogenesis of the associated PNS because, except for patients with LEMS, the frequency of AGNA in PNS is not higher than that in SCLC without PNS.

The distribution of PNS associated with AGNA differs from that seen with anti-Hu, anti-CV2/CRMP5, or other onconeural antibodies associated with SCLC and PNS in that AGNA is overrepresented in LEMS (Yu et al., 2001; Graus et al., 2001). Although a few SCLC patients with LEMS may harbor anti-Hu (Dropcho et al., 1989; Lucchinetti et al., 1998), Ri (Pittock et al., 2004), CV2/CRMP5 (Yu et al., 2001), or Zic4 (Bataller et al., 2003) antibodies, AGNA was detected in 43% of our series of LEMS and SCLC. We do not think this figure was biased because patients were selected by the presence of AGNA immunoreactivity without previous knowledge of the clinical features. Interestingly, all five patients with PCD, SCLC, and AGNA also had anti-VGCC antibodies suggesting that the immune responses to the tumor antigens might be linked in some way. However, the absence of AGNA in the serum of patients with non-paraneoplastic LEMS suggests that AGNA is induced by the SCLC independently of VGCC antibodies.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mercè Bonastre, Eva Caballero, and Tracey Newman for their excellent technical assistance. Supported in part by grants QLGI-CT-2002-01756 of the European Union and PI030028 Fondo de Investigaciones Sanitarias, Madrid, Spain (FG), and RO1CA107192 (JD). The authors thank all the neurologists who provided clinical information on their patients.

References

- Bataller, L., Wade, D.F., Graus, F., Rosenfeld, M.R., Dalmau, J., 2003. The MAZ protein is an autoantigen of Hodgkin's disease and paraneoplastic cerebellar dysfunction. *Ann. Neurol.* 53, 123–127.
- Bataller, L., Sabater, L., Saiz, A., Serra, C., Claramonte, B., Graus, F., 2004a. Carbonic anhydrase-related protein VIII: autoantigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann. Neurol.* 56, 575–579.
- Bataller, L., Wade, D.F., Graus, F., Stacey, H.D., Rosenfeld, M.R., Dalmau, J., 2004b. Antibodies to Zic4 in paraneoplastic neurologic disorders and small-cell lung cancer. *Neurology* 62, 778–782.
- Bernal, F., Shams'li, S., Rojas, I., Sanchez-Valle, R., Saiz, A., Dalmau, J., Honnorat, J., Silveis Smitt, P., Graus, F., 2003. Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Neurology* 60, 230–234.
- Cunningham, J., Graus, F., Anderson, N., Posner, J.B., 1986. Partial characterization of the Purkinje cell antigens in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neurology* 36, 1163–1168.
- Dropcho, E.J., Stanton, C., Oh, S.J., 1989. Neuronal antinuclear antibodies in a patient with Lambert–Eaton myasthenic syndrome and small-cell lung carcinoma. *Neurology* 39, 249–251.
- Graus, F., Dalmau, J., Valdeoriola, F., Ferrer, I., Rene, R., Marin, C., Vecht, C.J., Arbizu, T., Targa, C., Moll, J.W., 1997. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J. Neuroimmunol.* 74, 55–61.
- Graus, F., Verschuuren, J.J., Degenhardt, A., van Breda Vriesman, P.J., De Baets, M.H., Posner, J.B., Burton, D.R., Dalmau, J., 1998. Selection of recombinant anti-HuD Fab fragments from a phage display antibody library of a lung cancer patient with paraneoplastic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 82, 200–209.
- Graus, F., Keime-Guibert, F., Rene, R., Benyahia, B., Ribalta, T., Ascaso, C., Escaramis, G., Delatre, J.Y., 2001. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 124, 1138–1148.
- Graus, F., Lang, B., Pozo-Rosich, P., Saiz, A., Casamitjana, R., Vincent, A., 2002. P/Q type calcium-channel antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration with lung cancer. *Neurology* 59, 764–766.
- Graus, F., Delatre, J.Y., Antoine, J.C., Dalmau, J., Giometto, B., Grisold, W., Honnorat, J., Smitt, P.S., Vedeler, C., Verschuuren, J.J., Vincent, A., Voltz, R., 2004. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1135–1140.
- Gure, A.O., Stockert, E., Scanlan, M.J., Keresztes, R.S., Jager, D., Altorki, N.K., Old, L.J., Chen, Y.T., 2000. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4198–4203.
- Honnorat, J., Antoine, J.C., Derrington, E., Aguera, M., Belin, M.F., 1996. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 61, 270–278.
- Lucchinetti, C.F., Kimmelt, D.W., Lennon, V.A., 1998. Paraneoplastic and oncologic profiles of patients seropositive for type 1 antineuronal nuclear autoantibodies. *Neurology* 50, 652–657.
- Manley, G.T., Smitt, P.S., Dalmau, J., Posner, J.B., 1995. Hu antigens: reactivity with Hu antibodies, tumor expression, and major immunogenic sites. *Ann. Neurol.* 38, 102–110.
- Mason, W.P., Graus, F., Lang, B., Honnorat, J., Delatre, J.Y., Valdeoriola, F., Antoine, J.C., Rosenblum, M.K., Rosenfeld, M.R., Newsom-Davis, J., Posner, J.B., Dalmau, J., 1997. Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert–Eaton myasthenic syndrome. *Brain* 20 (Pt 8), 1279–1300.
- Moll, J.W., Antoine, J.C., Brashear, H.R., Delatre, J., Drlicek, M., Dropcho, E.J., Giometto, B., Graus, F., Greenlee, J., Honnorat, J., et al., 1995. Guidelines on the detection of paraneoplastic anti-neuronal-

- specific antibodies: report from the workshop to the fourth meeting of the international society of neuro-immunology on paraneoplastic neurological disease held October 22–23, 1994, in Rotterdam, The Netherlands. *Neurology* 45, 1937–1941.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., Smith, A.M., 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201–211.
- O'Neill, J.H., Murray, N.M., Newsom-Davis, J., 1988. The Lambert–Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. *Brain* 111 (Pt 3), 577–596.
- Pitcock, S.J., Kryzer, T.J., Lennon, V.A., 2004. Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann. Neurol.* 56, 715–719.
- Saiz, A., Arpa, J., Sagasta, A., Casamitjana, R., Zarranz, J.J., Tolosa, E., Graus, F., 1997. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in three patients with cerebellar ataxia, late-onset insulin-dependent diabetes mellitus, and polyendocrine autoimmunity. *Neurology* 49, 1026–1030.
- Vincent, A., Honnorat, J., Antoine, J.C., Giometto, B., Dalmau, J., Lang, B., 1998. Autoimmunity in paraneoplastic neurological disorders. *J. Neuroimmunol.* 84, 105–109.
- Yamada, K., Watanabe, M., 2002. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat. Sci. Int.* 77, 94–108.
- Yu, Z., Kryzer, T.J., Griesmann, G.E., Kim, K., Benarroch, E.E., Lennon, V.A., 2001. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. *Ann. Neurol.* 49, 146–154.