



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



CRIBADO SISTEMÁTICO  
DE AUTOANTICUERPOS EN  
**NEUROPATÍAS  
INMUNOMEDIADAS**

TESIS DOCTORAL

ANA M<sup>ª</sup> SILES GÓMEZ

2018





**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona

## TESIS DOCTORAL

# CRIBADO SISTEMÁTICO DE AUTOANTICUERPOS EN NEUROPATÍAS INMUNOMEDIADAS

Autora: Ana M<sup>a</sup> Siles Gómez

Directores: Luis Antonio Querol Gutiérrez y Eduard Gallardo Vigo

Tutora: Isabel Illa Sendra

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universidad Autònoma de Barcelona

2018





A Miquel

A mis padres, José y Charo

A mi abuela Bella

A Pablo



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
AIS: Segmento inicial del axón  
ARN: Ácido ribonucleico  
BHE: Barrera hemato-encefálica  
BHN: Barrera hemato-nerviosa  
Breg: Células B reguladoras  
CAMs: Moléculas de adhesión celular  
CASPR1: Proteína asociada a Contactina 1  
CASPR2: Proteína asociada a Contactina 2  
CIDP: Poliradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica  
CNTN1: Contactina 1  
CNTN2: Contactina 2  
CPA: Células presentadoras de antígeno  
CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas  
CR1: Receptor del complemento 1  
DADS: Variante de CIDP distal adquirida desmielinizante simétrica  
DAF: Factor acelerador del decaimiento  
EAE: Encefalomiелitis autoinmune experimental  
EAN: Neuritis alérgica experimental  
EFNS/PNS: European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society  
ELISA: Ensayo de inmunoabsorción asociado a enzima  
EMG: Electromiograma  
Epo: Eritropoyetina  
GMD: Gliomedina  
GRD: Ganglios raquídeos dorsales  
HEK: Células embrionarias de riñón humano  
HIF-1: Factor inducible por hipoxia 1  
ICAM1: Molécula de adhesión intercelular 1  
IFN- $\gamma$ : Interferón  $\gamma$   
IgIV: Inmunoglobulinas endovenosas  
IL: Interleucina  
IL-1R: Receptor de interleucina 1  
IL-1Ra: Antagonista del receptor de interleucina 1  
iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

LCR: Líquido cefalorraquídeo  
LIF: Factor inhibidor de leucemia  
LPS: Lipopolisacárido  
MAC: Complejo de ataque de membrana  
MADSAM: Variante de CIDP multifocal adquirida desmielinizante sensitiva y motora  
MAG: Glicoproteína asociada a la mielina  
MCP: Proteína de cofactor de membrana  
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1  
MGUSP: Polineuropatía asociada a gammapatía monoclonal de significado incierto  
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad  
MMP: Metaloproteinasas de matriz  
NdR: Nodo de Ranvier  
NF155: Neurofascina 155  
NF186: Neurofascina 186  
NMM: Neuropatía Motora Multifocal  
NrCAM: Molécula de adhesión neuronal  
ON: Óxido nítrico  
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos  
PMP22: Proteína de la mielina periférica 22  
PRRs: Receptores reconocedores de patrones  
SGB: Síndrome de Guillain-Barré  
SNC: Sistema nervioso central  
SNP: Sistema nervioso periférico  
SNPs: Síndromes neurológicos paraneoplásicos  
SSN: Neuronopatía sensitiva subaguda  
SynCAMs: Moléculas de adhesión sinápticas  
TAG1: Glicoproteína axonal transitoriamente expresada 1  
TCR: Receptor de célula T  
TEM: Migración transendotelial  
TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$   
TLRs: Receptores tipo Toll  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
Treg: Células T reguladoras  
VCAM1: Molécula de adhesión vascular 1



ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	5
ÍNDICE .....	7
AGRADECIMIENTOS .....	9
ABSTRACT .....	11
RESUMEN.....	13
INTRODUCCIÓN .....	17
1.1 El nervio periférico.....	17
1.1.1 Estructura y tipos de fibra nerviosa.....	17
1.1.2 El proceso de mielinización en el SNP .....	19
1.1.3 El nodo de Ranvier.....	20
1.1.4 Inmunología en el Sistema Nervioso Periférico.....	24
1.1.4.1 Inmunidad celular en el nervio periférico .....	25
1.1.4.1.1 Activación de la célula T.....	26
1.1.4.1.2 Migración transendotelial.....	26
1.1.4.1.3 Función efectora en el nervio periférico.....	27
1.1.4.1.4 Terminación de la inflamación.....	28
1.1.4.2 Inmunidad humoral en el nervio periférico.....	29
1.1.4.2.1 Anticuerpos .....	29
1.1.4.2.2 Mecanismos anticuerpo-independientes.....	31
1.1.4.3 Inmunocompetencia de las células de Schwann.....	32
1.1.4.3.1 Reconocimiento de antígenos.....	32
1.1.4.3.2 Regulación del sistema del complemento .....	34
1.1.4.3.3 Presentación de antígenos .....	35
1.1.4.3.4 Funciones efectoras .....	35
1.1.4.3.5 Terminación de la inflamación.....	36
1.2 Neuropatías autoinmunes .....	37
1.2.1 Introducción .....	37
1.2.2. Características clínicas de las neuropatías autoinmunes .....	38
1.2.2.1 Poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP).....	38
1.2.2.2 Neuropatías paraneoplásicas .....	42
1.2.3 Inmunopatogenia de las neuropatías autoinmunes .....	48
1.2.3.1 Inmunopatogenia de la CIDP .....	48
1.2.3.1.1 Histopatología .....	48
1.2.3.1.2 Inmunidad celular.....	50

## ÍNDICE

---

1.2.3.1.3 Inmunidad humoral .....	51
1.2.3.1.3.1 Anticuerpos contra la mielina y los gangliósidos.....	52
1.2.3.1.3.2 Anticuerpos contra estructuras del Nodo de Ranvier .....	53
1.2.3.2 Inmunopatogenia de las neuropatías paraneoplásicas .....	54
1.2.3.2.1 Histopatología .....	54
1.2.3.2.2 Inmunidad celular.....	54
1.2.3.2.3 Inmunidad humoral .....	56
HIPÓTESIS.....	63
2.1 HIPÓTESIS GENERAL .....	63
2.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS .....	63
2.2.1 Reactividades antigénicas en CIDP.....	63
2.2.2 Reactividades antigénicas en neuropatías paraneoplásicas .....	64
OBJETIVOS .....	67
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	67
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	67
3.2.1 Reactividades antigénicas en CIDP.....	67
3.2.2 Reactividades antigénicas en neuropatías paraneoplásicas .....	67
RESULTADOS.....	71
4.1 ARTÍCULO I.....	71
Material suplementario.....	80
4.2 ARTÍCULO II.....	85
Material suplementario.....	96
SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
5.1 ARTÍCULO I .....	103
5.1.1 Síntesis de resultados .....	103
5.1.2 Relevancia.....	105
5.2 ARTÍCULO II.....	106
5.2.1 Síntesis de resultados .....	106
5.2.2 Relevancia .....	108
CONCLUSIONES .....	111
LINEAS DE FUTURO .....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	119

### AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Luis y Edu, por su paciencia, su dedicación y porque sin su ayuda esta tesis no habría salido adelante. Gracias por las inquietudes resueltas, las mil correcciones y sobre todo por no ponerme una orden de alejamiento.

A la Dra. Illa, por abrirme las puertas de la unidad y acogerme cuatro años en ella.

A todos los miembros del Departamento de Neurología del Hospital de Sant Pau. Por ofrecerme una infraestructura imprescindible en el desarrollo de esta tesis.

A los postdocs del laboratorio, Xavi y Noemí, por estar ahí para cada duda, científica o de cualquier otra índole. Por su disposición y buen rollo.

A la sección más clínica de la unidad, Ricard, Jordi, Elena, Alicia y Janina. Por las horas y los conocimientos que habéis compartido.

A Sonia, por los consejos y todos los mails supervisados. Por ser una compañera de mesa a echar de menos.

A Patricia, por ser mi compi de fatigas predoctorales. Porque hacer la tesis sin gatos que hablan arameo y sin momentos “square” no habría sido lo mismo.

A Ana, Cinti, Esther, Patricia y Sonia otra vez. Gracias por las risas, las cadenas humanas, las horas compartidas y por aceptarme a pesar de no haber visto UPA Dance. Porque hacer la tesis entre amigas ha sido lo mejorcito de esta experiencia.

A Fina, por las horas de ratas y de neuronas compartidas.

A Alba, Aida, Gisela, Roser, Maialen, Lorena y todas las personas con las que he tenido la suerte de coincidir brevemente en el laboratorio. Gracias por vuestra generosidad, vuestra ayuda y compañerismo.

A Isidoro, por darme la oportunidad de conocer mi primer laboratorio. Por inocularme el virus y por haber sido el mejor profesor que podía pedir.

## AGRADECIMIENTOS

---

A Montse, Ana y Raquel por darme el empujón para iniciar esta aventura. A Jordi, Carlota, Eva y Santi por ser unos compis de poyata extraordinarios.

A Vero, Ulfi, Lluís, Mavi, Krasi, Luz, Valle, María, Bárbara y todos los compis del aeropuerto. Gracias por vuestro cariño y por los ratos compartidos.

A Irene, porque hay amigas que se convierten en hermanas.

A mi familia, por estar siempre ahí. Por vuestro cariño y vuestro apoyo incondicional. Porque nada de esto habría sido posible sin vosotros.

A Miquel, por hacerme feliz todos los días.

**ABSTRACT**

Inflammatory neuropathies are rare autoimmune diseases of the peripheral nerve that encompass multiple conditions, including Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) and paraneoplastic neuropathies. Although the pathogenesis of these diseases remains largely unknown, autoantibodies have been postulated to play a pivotal role in disease progression. Identification of novel autoantibodies in these conditions might provide new biomarkers with relevant clinical implications in the diagnosis, prognosis and treatment of these patients.

**Antibodies against peripheral nerve antigens in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.**

Luis Querol MD PhD, Ana M<sup>a</sup> Siles MSc, Roser Alba-Rovira MSc, Agustín Jáuregui MD, Jerome Devaux PhD, Catherine Faivre-Sarrailh PhD, Josefa Araque BN, Ricard Rojas-Garcia MD PhD, Jordi Diaz-Manera MD PhD, Elena Cortés-Vicente MD, Gisela Nogales-Gadea PhD, Miquel Navas-Madroñal MSc, Eduard Gallardo PhD, Isabel Illa MD PhD.

CIDP is a heterogeneous condition featuring a lack of clinically-useful biomarkers, in which the description of specific autoantibodies would benefit patients' diagnosis and prognosis, as has been previously demonstrated with the discovery of antibodies against paranodal proteins.

In this study, a group of 65 CIDP patients were screened for IgG and IgM reactivity against previously described antigens as well as for new reactivities towards dorsal root ganglia neurons, motor neurons and Schwann cells. A subset of seronegative CIDP patients reacted against neural structures and gangliosides. However, immunoprecipitation experiments in patients reacting against neural cells did not reveal novel antigens, and frequencies of reactivity against neural cells did not differ from normal controls.

**Conclusion:** Although immunoprecipitation experiments failed to identify novel antigens, we provide the most comprehensive autoantibody screening study performed to date in CIDP and demonstrate a heterogeneous autoantibody profile in CIDP patients, reinforcing the hypothesis of a significant pathophysiological heterogeneity in this disease.



**Antibodies against cell adhesion molecules and neural structures in paraneoplastic neuropathies**

Ana M<sup>a</sup> Siles MSc, Eugenia Martínez-Hernández MD PhD, Josefa Araque BN, Jordi Diaz-Manera MD PhD, Ricard Rojas-Garcia MD PhD, Eduard Gallardo PhD, Isabel Illa MD PhD, Francesc Graus MD PhD, Luis Querol MD PhD.

Paraneoplastic neuropathies are rare immune-mediated neurological conditions in which description of novel specific autoantibodies might benefit patients' diagnosis and prognosis. Two of our CIDP patients with antibodies against Contactin 1 (CNTN1) developed cancer in addition to their neuropathy. Since CNTN1, as well as other cell adhesion molecules have been described to contribute to cancer pathogenesis, we assessed their possible involvement as antigens in patients with paraneoplastic neuropathies.

In this study, a group of 34 patients with paraneoplastic neuropathies were screened for reactivity against neural cell adhesion molecules as well as for new IgG and IgM reactivities towards relevant neural structures. Overall, nine (26.5%) patients showed significant reactivity against dorsal root ganglia neurons, motor neurons or Schwann cells. Compared with control sera, serum samples from patients with paraneoplastic sensory motor neuropathies had a higher frequency of IgM antibodies against Schwann cells.

**Conclusion:** Although our experiments failed to identify novel antigens in paraneoplastic neuropathies, we provide a comprehensive autoantibody screening study that not only demonstrates the heterogeneous autoantibody profile in these patients but also proves that a remarkable proportion of them target dorsal root ganglia neurons, motor neurons or Schwann cells.

## RESUMEN

Las neuropatías inflamatorias son enfermedades autoinmunes raras del nervio periférico que engloban múltiples afecciones. Entre ellas, la Poliradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) y las neuropatías paraneoplásicas. Aunque la patogenia de estas enfermedades es desconocida, se considera que los autoanticuerpos presentan un papel crucial en su desarrollo. La identificación de autoanticuerpos en estos trastornos puede suponer la detección de nuevos biomarcadores con implicaciones clínicas relevantes para el diagnóstico, el pronóstico y el manejo terapéutico de estos pacientes.

**Antibodies against peripheral nerve antigens in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.**

Luis Querol MD PhD, Ana M<sup>a</sup> Siles MSc, Roser Alba-Rovira MSc, Agustín Jáuregui MD, Jerome Devaux PhD, Catherine Faivre-Sarrailh PhD, Josefa Araque BN, Ricard Rojas-Garcia MD PhD, Jordi Diaz-Manera MD PhD, Elena Cortés-Vicente MD, Gisela Nogales-Gadea PhD, Miquel Navas-Madroñal MSc, Eduard Gallardo PhD, Isabel Illa MD PhD.

La CIDP es un trastorno heterogéneo en el que, en general, no existen biomarcadores útiles clínicamente. La descripción de autoanticuerpos específicos en esta enfermedad podría beneficiar el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes; tal y como se ha demostrado previamente con el descubrimiento de anticuerpos contra proteínas paranodales.

En este estudio, se realizó un cribado en 65 pacientes con CIDP para detectar la reactividad de tipo IgG e IgM contra antígenos previamente descritos en esta enfermedad, así como para detectar nuevas reactividades contra neuronas de ganglios raquídeos dorsales, neuronas motoras y células de Schwann. Un subconjunto de pacientes con CIDP seronegativa reaccionó contra estructuras neurales y gangliósidos. Sin embargo, los experimentos de inmunoprecipitación en aquellos pacientes que reaccionaron contra células neurales no revelaron nuevos antígenos, y las frecuencias de reactividad de estos pacientes no difirieron de las observadas en controles sanos.

**Conclusión:** Aunque los experimentos de inmunoprecipitación no han permitido la identificación de nuevos antígenos, nuestro estudio es el mayor estudio de cribado de

autoanticuerpos realizado hasta la fecha en la CIDP y demuestra que existe un perfil muy diverso de autoanticuerpos en estos pacientes, reforzando la hipótesis de una fisiopatología heterogénea en esta enfermedad.

**Antibodies against cell adhesion molecules and neural structures in paraneoplastic neuropathies**

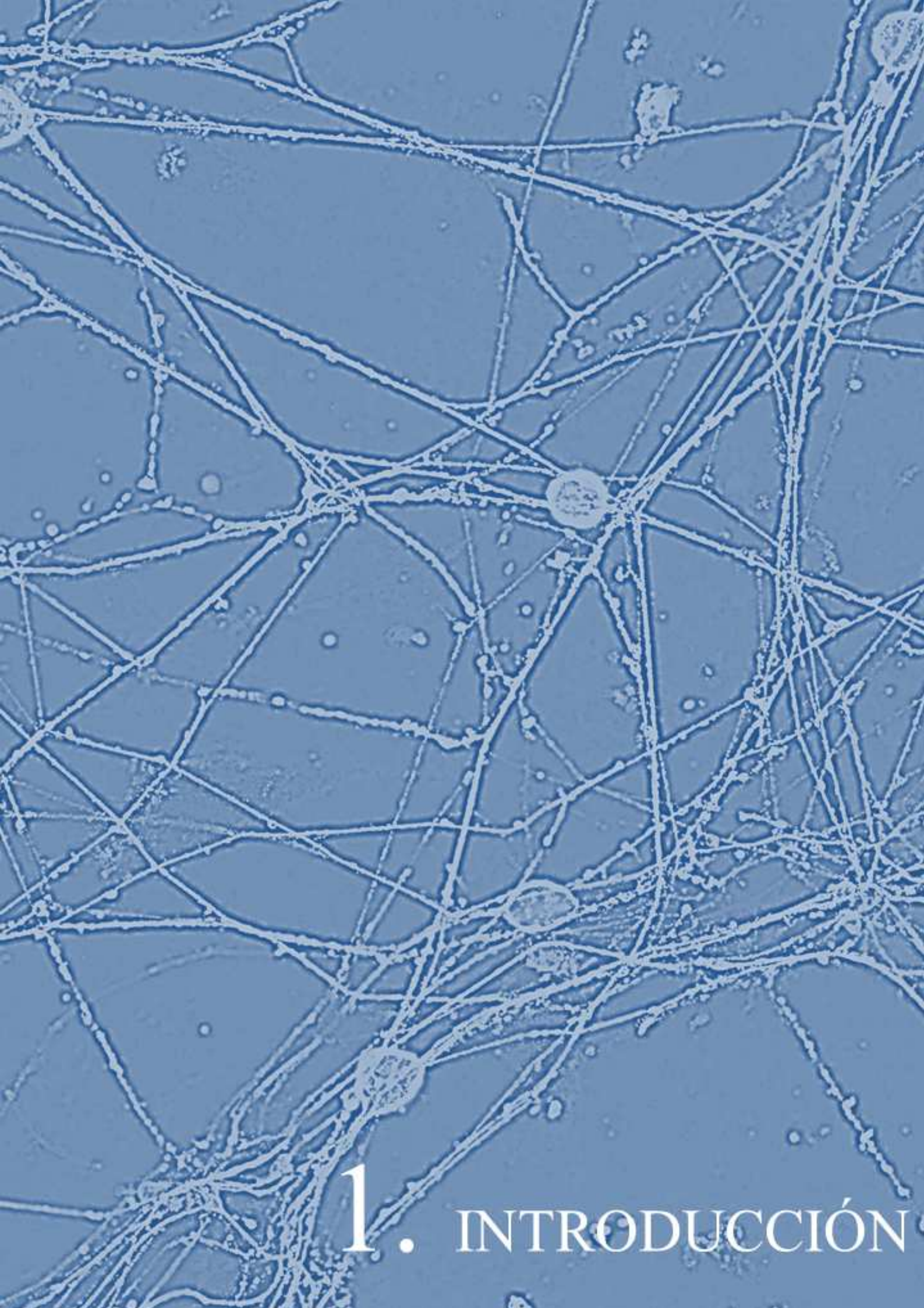
Ana M<sup>a</sup> Siles MSc, Eugenia Martínez-Hernández MD PhD, Josefa Araque BN, Jordi Diaz-Manera MD PhD, Ricard Rojas-Garcia MD PhD, Eduard Gallardo PhD, Isabel Illa MD PhD, Francesc Graus MD PhD, Luis Querol MD PhD.

Las neuropatías paraneoplásicas son afecciones neurológicas inmunomediadas raras en las que la descripción de nuevos autoanticuerpos específicos podría beneficiar el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes. Dos de los pacientes con CIDP de nuestra unidad con anticuerpos contra Contactina 1 (CNTN1) desarrollaron cáncer además de su neuropatía. Dado que se ha descrito que CNTN1, así como otras moléculas de adhesión celular, contribuyen en la patogénesis del cáncer, se evaluó su papel como posibles antígenos en pacientes con neuropatías paraneoplásicas.

En este estudio, se realizó un cribado en 34 pacientes con neuropatías paraneoplásicas en busca de reactividades contra moléculas neurales de adhesión celular, así como reactividades de tipo IgG e IgM contra estructuras neurales relevantes. Nueve pacientes (26,5%) mostraron una reactividad significativa contra las neuronas de los ganglios raquídeos dorsales, neuronas motoras o células de Schwann. En comparación con controles sanos, los pacientes con neuropatías paraneoplásicas sensitivo-motoras presentaron una mayor frecuencia de anticuerpos de tipo IgM contra las células de Schwann.

**Conclusión:** Aunque nuestros experimentos no identificaron nuevos antígenos en neuropatías paraneoplásicas, éste es un estudio exhaustivo de detección de autoanticuerpos que no solo demuestra el perfil heterogéneo de estos pacientes sino que también demuestra que una proporción notable de ellos presenta reactividad contra neuronas de ganglios raquídeos dorsales, neuronas motoras o células de Schwann.





# 1. INTRODUCCIÓN





## INTRODUCCIÓN

### 1.1 EL NERVIIO PERIFÉRICO

El sistema nervioso periférico (SNP) es el sistema encargado de comunicar el cerebro y la médula espinal con el resto de miembros y órganos del cuerpo. Éste comprende las raíces nerviosas ventrales (motoras) y dorsales (sensitivas), los ganglios espinales y vegetativos, la unión neuromuscular y todos los nervios periféricos. Se incluyen también 10 pares de nervios craneales, exceptuando así los nervios olfatorio y óptico que pertenecen al sistema nervioso central (SNC), y 31 pares de nervios espinales.

Las fibras nerviosas son estructuras cordonaes formadas por axones neuronales y células de Schwann delimitadas por una membrana basal. En función del tipo neuronal presente (neuronas sensitivas, motoras vegetativas o motoras somáticas), los nervios se pueden clasificar en sensitivos (aférentes), motores (eferentes) o mixtos<sup>1</sup>.

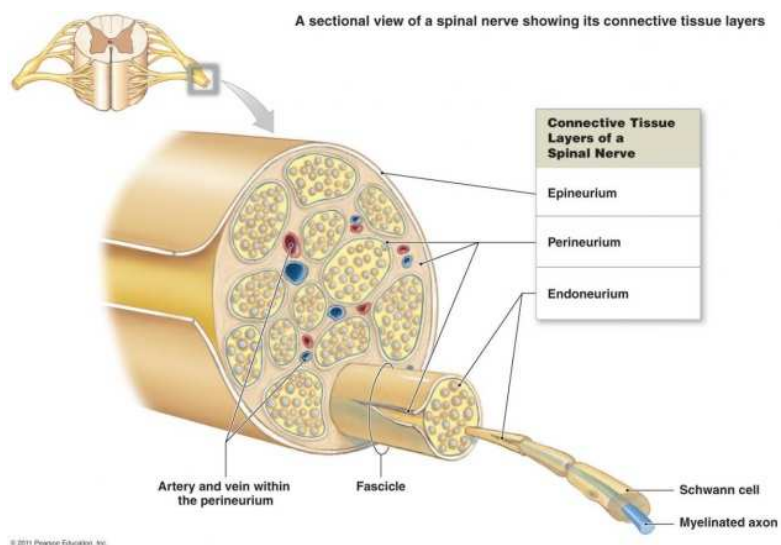


Figura 1. Estructura de la fibra nerviosa. Cortesía de Pearson Education, Inc.

#### 1.1.1 ESTRUCTURA Y TIPOS DE FIBRA NERVIOSA

Cada una de las fibras nerviosas mielínicas o amielínicas del SNP, transcurren dentro de una vaina de tejido conectivo que las aísla llamada endoneuro. Dichas fibras se agrupan en fascículos delimitados por una lámina flexible formada por capas concéntricas conocida como perineuro y finalmente, grupos o uno solo de estos haces de fibras, en función de si el nervio es mono o multifascicular, se recubren a su vez de una capa conectiva fibrosa conocida como epineuro<sup>2</sup>. Esta última capa, que representa el 30-75% de superficie de la sección total del nervio, está formada por fibroblastos, colágeno y tejido graso en

diferentes proporciones y no sólo es la responsable de fijar el nervio y aislarlo de sus estructuras adyacentes, sino que también alberga en su región más exterior los vasos capilares y linfáticos que lo irrigan, conocidos como *vasa nervorum*. (Figura 1). Estos vasos se ramifican en pequeñas arterias y arteriolas que penetran en el epineuro y a su vez se ramifican para penetrar en las capas concéntricas inferiores<sup>3</sup>.

En función de sus características funcionales, diámetro, velocidad de conducción y presencia o no de vaina de mielina, podemos clasificar las fibras nerviosas en diferentes tipos<sup>4</sup> (Tabla 1). Las fibras gruesas (mielínicas de tamaño mediano o grande) conducen las sensaciones del tacto, presión y propiocepción, la porción aferente de los reflejos musculares y los impulsos motores. Las fibras finas (mielínicas de diámetro reducido y fibras amielínicas), conducen las sensaciones térmicas, nociceptivas y autonómicas<sup>5</sup>.

Clasificación Erlanger y Gasser	Clasificación Numérica	Función	Diámetro (µM)	Mielina	Velocidad conducción (m/s)
Aα	Ia	Motor somático, propiocepción (husos musculares)	12-20	+	70-120
Aα	Ib	Propiocepción (Órganos de Golgi)	12-20	+	70-120
Aβ	II	Tacto, presión	5-12	+	30-70
Aγ		Motor (husos musculares)	3-6	+	15-30
Aδ	III	Dolor, temperatura, tacto	2-5	+	5-30
B		Preganglionares autonómicas	<3	-	3-15
C	IV	Dolor, temperatura, mecanorreceptores, postganglionares autonómicas	0.3-1.3	-	1-2

Tabla 1. Tipos de fibras nerviosas. Tabla modificada de Marani et al<sup>5</sup>.

1.1.2 EL PROCESO DE MIELINIZACIÓN EN EL SNP

Las fibras nerviosas del sistema periférico pueden estar mielinizadas (fibras mielínicas) o no mielinizadas (fibras amielínicas). La mielina es una sustancia multilamelar compuesta por fosfolípidos, glicolípidos (cerebrósidos, sulfátidos y gangliósidos), colesterol y por una fracción proteica que incluye, entre otras, las glicoproteínas P0, P1, P2, la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) y la proteína de la mielina periférica 22 (PMP22)<sup>2</sup>. A diferencia del SNC, donde los oligodendrocitos son responsables de la mielinización del axón, en el SNP, las células de Schwann son las células gliales encargadas de este proceso<sup>6,7</sup>. La mielinización se produce cuando múltiples capas de doble membrana plasmática recubren el axón en forma de espiral<sup>8</sup> (Figura 2).

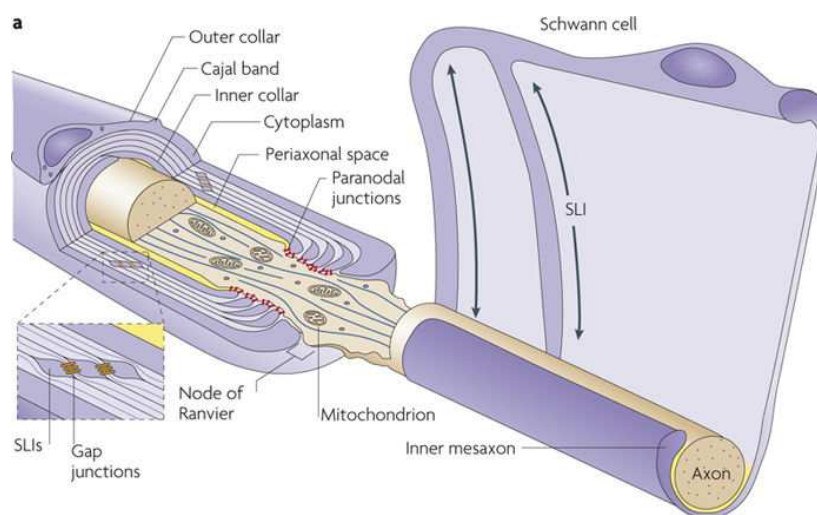


Figura 2. Mielinización del axón en el SNP. Figura modificada de Nave 2010<sup>9</sup>.

Las células de Schwann también se encargan de dar soporte trófico e intervienen en procesos de regeneración del axón<sup>10</sup>. En el caso de las fibras amielínicas, una célula de Schwann engloba varios axones en su citoplasma proporcionándoles soporte<sup>2</sup>. En fibras mielínicas, por el contrario, una célula de Schwann engloba en su citoplasma un solo axón, mielinizando segmentos de aproximadamente 100  $\mu\text{m}^2$ . Entre dichos segmentos mielinizados adyacentes, existen pequeños segmentos de axón no mielinizados de 1-2  $\mu\text{m}$  denominados Nodos de Ranvier (NdR)<sup>2</sup>. El espacio mielinizado comprendido entre dos nodos consecutivos se denomina internodo. Dado que las vainas de mielina aíslan los axones y disminuyen su capacitancia, la exposición de los NdR permite una regeneración del potencial de acción que hace que la conducción nerviosa sea saltatoria<sup>11</sup>. De esta forma,

se aumenta la velocidad de conducción de estas fibras con respecto a sus homólogas no mielinizadas, donde la conducción del impulso nervioso es continua (Figura 3).

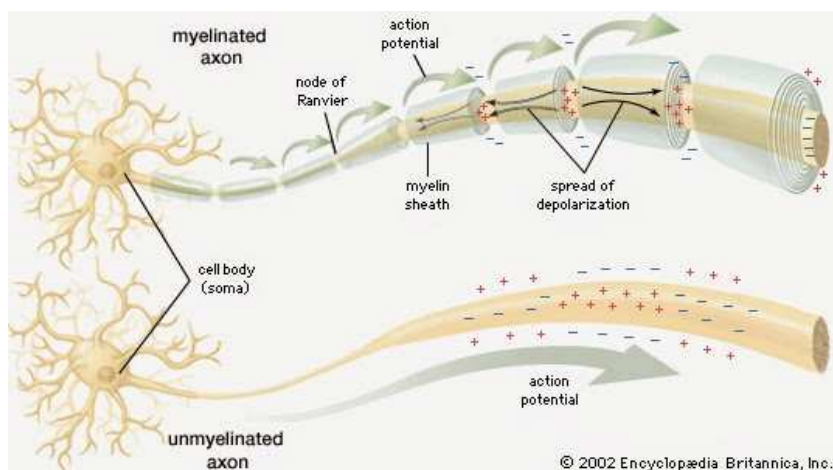


Figura 3. Tipos de conducción nerviosa. Cortesía de Encyclopædia Britannica, Inc.

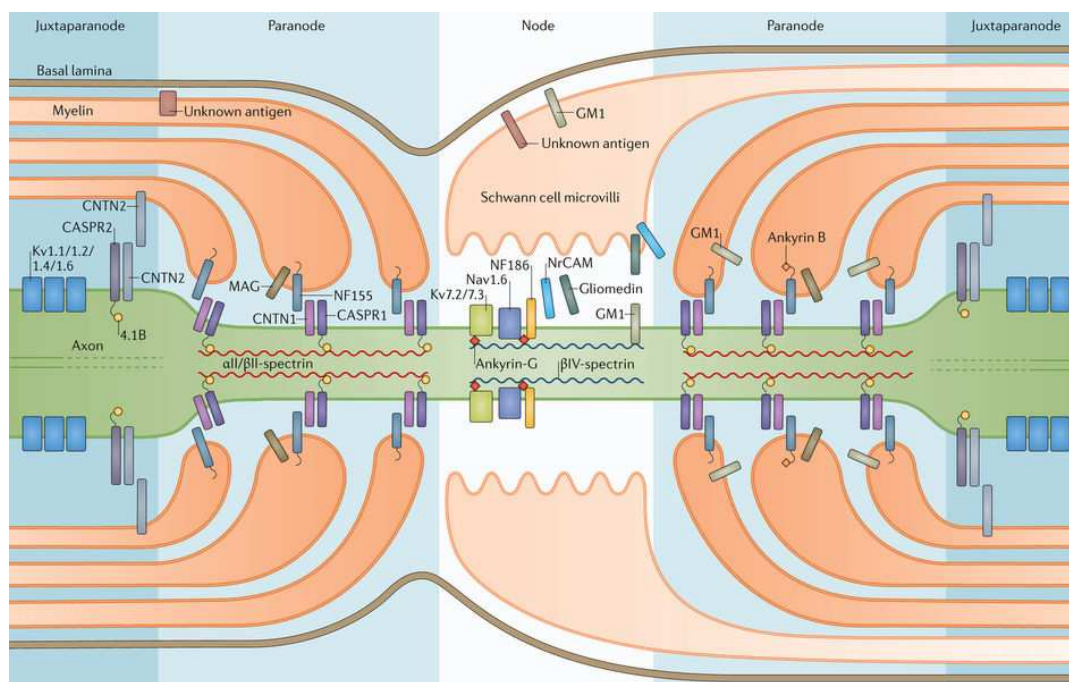
### 1.1.3 EL NODO DE RANVIER

El proceso de mielinización divide la membrana axonal en cuatro dominios estructurales y funcionales claramente diferenciados: NdR, paranodos, yuxtaparanodos e internodos<sup>12</sup> (Figura 4).

Los NdR son pequeños segmentos de axón no mielinizados de 1-2  $\mu\text{m}$  comprendidos entre internodos mielinizados adyacentes<sup>13</sup>. Éstos se distribuyen de forma regular a lo largo de una fibra nerviosa, y son los responsables de que la conducción nerviosa sea saltatoria<sup>10</sup>. En los NdR, el axón entra en contacto directo con el medio extracelular, la matriz extracelular y las prolongaciones de membrana de las células de Schwann contiguas, conocidas como microvellosidades<sup>14</sup>. Los componentes principales del NdR son los canales iónicos voltaje dependientes. El resto de sus componentes, moléculas de adhesión celular (CAMs), proteínas de la matriz extracelular y proteínas citoplasmáticas, tienen la función de agrupar y estabilizar dichos canales<sup>15</sup>.

El NdR contiene diferentes subclases de canales dependientes de voltaje responsables de la rápida despolarización y repolarización del axón necesaria para la propagación del impulso nervioso<sup>16</sup>. Los principales son los canales de sodio voltaje dependientes, Nav1.6 principalmente, responsables de la entrada masiva de sodio cuando se da un potencial de

acción<sup>14</sup>. También están presentes los canales de potasio KCNQ2 y KCNQ3, encargados de estabilizar el potencial de reposo y de prevenir la concatenación de potenciales de acción<sup>14</sup>. Ambos tipos de canales quedan anclados al citoesqueleto axonal gracias a los complejos formados por las proteínas anquirina G y  $\beta$ IV espectrina.



Nature Reviews | Neurology

Figura 4. Estructura del Nodo de Ranvier. Imagen extraída de Querol et al. 2017<sup>17</sup>.

Adicionalmente, el NdR consta de otras CAMs como la neurofascina 186 (NF186) o la molécula de adhesión neuronal (NrCAM) cuya función es unirse a la anquirina G y estabilizar los complejos de estos canales en el NdR<sup>18</sup>. En el SNP, NF186 y NrCAM se unen a la gliomedina (GMD), otra molécula de adhesión expresada en las microvellosidades de las células de Schwann que contribuye a que el anclaje de los canales de sodio y potasio sea doble, por una parte al citoesqueleto del axón y por otra a la célula de Schwann<sup>19</sup>. Aunque la composición molecular de los NdR en el SNP y el SNC es similar, sus mecanismos de ensamblaje son diferentes, en parte debido a las diferencias en las células gliales implicadas en el proceso de mielinización<sup>12</sup>.

Cada NdR está flanqueado por ambos lados por dos dominios claramente diferenciados entre sí, un dominio más proximal denominado paranodo y otro más distal que recibe el nombre de juxtapanodo. El paranodo es el dominio encargado de fijar la vaina de



mielina al axón, donde los bucles de membrana de la célula de Schwann (situados a 3-5 nm) se unen al axolema formando septos<sup>12</sup>. Estas uniones axo-gliales confieren al paranodo una función de barrera esencial que impide la difusión lateral de moléculas entre el nodo y el yuxtaparanodo, contribuyen a la fijación de canales de sodio en el NdR y permiten aislar la actividad eléctrica del axolema nodal con respecto a la del axolema internodal<sup>19</sup>. Las uniones axo-gliales del paranodo están formadas por complejos entre las proteínas axonales contactina 1 (CNTN1) y proteína asociada a contactina 1 (CASPR1), que forman un dímero, y la isoforma 155 de la neurofascina (NF155), expresada por la célula de Schwann<sup>18</sup>. Este complejo CNTN1/CASPR1/NF155 queda anclado mediante su unión, vía NF155, a la anquirina B glial. Su unión al citoesqueleto del axón se lleva a cabo mediante la proteína de anclaje 4.1.B y a las isoformas  $\alpha$ II y  $\beta$ II de espectrina<sup>20</sup>.

El yuxtaparanodo es el dominio situado bajo la vaina de mielina compacta que hace de interfaz entre el paranodo y el internodo<sup>16</sup>. Esta región está enriquecida en canales de potasio voltaje dependientes, Kv1.1 y Kv1.2 principalmente, cuya función es la de repolarizar el axón<sup>20</sup>. Como en los dominios paranodales, el anclaje de los canales de potasio al citoesqueleto del axón se lleva a cabo mediante la proteína de anclaje 4.1.B y a las isoformas  $\alpha$ II y  $\beta$ II de espectrina. Este anclaje está mediado por el complejo formado por la proteína asociada a contactina 2 (CASPR2) y la glicoproteína axonal transitoriamente expresada 1 (TAG1), también conocida como contactina 2 (CNTN2), unidas a la forma de TAG1 glial<sup>13</sup>. Si bien este complejo es necesario para el agrupamiento de los canales de potasio, los nexos de unión implicados entre ambos no están del todo caracterizados.

El internodo es la región anexa al yuxtaparanodo y se corresponde al dominio estructural más extenso en superficie<sup>12</sup>. Como los dominios adyacentes, éste contiene CAMs que estabilizan la unión entre el axón mielinizado y la membrana adaxonal de la célula de Schwann. Es el caso de las nectin-like CAMs (Nec11, Nec12 y Nec14), la glicoproteína MAG y las moléculas de adhesión sinápticas (SynCAMs)<sup>14</sup>. En el SNP, la longitud internodal o distancia entre NdR, viene determinada por dos factores. Al igual que la velocidad de conducción, la distancia internodal es mayor en aquellos axones de mayor diámetro. Adicionalmente, ésta se ve aumentada por el crecimiento longitudinal de la región inervada<sup>19</sup>. Si bien dicho crecimiento también contribuye a aumentar la velocidad

de conducción de la fibra nerviosa, esta relación no es linealmente dependiente de la distancia internodal, pues la velocidad de conducción llega a una meseta como consecuencia del aumento de la capacitancia a medida que incrementa la distancia internodal<sup>21</sup>.

En las fibras mielínicas del SNP, la organización de la fibra nerviosa en distintos dominios funcionales es indispensable para la óptima propagación del impulso nervioso<sup>14</sup>. La conducción nerviosa se inicia en el soma de la neurona o en los terminales periféricos (en el caso de las neuronas sensitivas) cuando en el segmento inicial del axón (AIS), un microdominio excitable especializado de composición similar al NdR, se genera un potencial de acción que supera el umbral de despolarización de la neurona<sup>20</sup>. Este potencial de acción se transmite a lo largo del axón de forma saltatoria gracias a la despolarización mediada por los canales de sodio de los sucesivos NdR<sup>12</sup>. La consiguiente repolarización e hiperpolarización del axón tiene lugar gracias a la apertura de los canales de potasio yuxtaparanodales, que permiten la salida celular masiva de potasio. Tras un periodo refractario en el cual los canales de sodio permanecen inactivos, impidiendo así la bidireccionalidad del impulso nervioso, se consigue llegar al potencial de reposo de membrana<sup>22</sup>.

La compartimentalización de los dominios axonales previamente descritos, es clave para garantizar una correcta conducción saltatoria, pues la pérdida de uniones paranodales en septo se asocia a translocación de canales de potasio Kv1 del yuxtaparanodo al nodo y a anomalías en la conducción nerviosa<sup>12,14,20</sup>. Estudios experimentales han demostrado que mutaciones en componentes del NdR y sus estructuras adyacentes se asocian a la aparición de múltiples afectaciones del sistema nervioso, tales como déficits cognitivos, ataxia, atrofia cerebelosa, desorden bipolar y diversas formas de epilepsia<sup>11,12,18</sup>. Adicionalmente, en las neuropatías inflamatorias se ha descrito un nuevo patrón electrofisiológico asociado a afectaciones nodo-paranodales, denominado fallo de conducción reversible o bloqueo axonal. Este patrón es diferente de los patrones electrofisiológicos clásicos desmielinizantes o axonales<sup>23,24</sup>. En conclusión, la división de la membrana axonal en dominios estructurales y funcionales claramente diferenciados contribuye a una conducción nerviosa fisiológica y su disrupción puede conllevar implicaciones neuropatológicas<sup>14</sup>.

1.1.4 INMUNOLOGÍA EN EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO

Con el fin de preservar una correcta conducción nerviosa, esencial para la comunicación entre el SNC y el resto de miembros y órganos del cuerpo, el SNP está sujeto a una estrecha regulación inmunológica. Similar al SNC, donde se encuentra la barrera hematoencefálica (BHE), el SNP consta de una barrera restrictiva que lo aísla y que recibe el nombre de barrera hemato-nerviosa (BHN). La BHN separa el espacio endoneural del espacio endovascular y del tejido conectivo del epineuro y está constituida mayoritariamente por células endoteliales de la microvasculatura del endoneuro y por miofibroblastos de las capas más profundas del perineuro (*pars epitheloidea*) interconectados mediante uniones estrechas u oclusivas<sup>25,26</sup> (Figura 5).

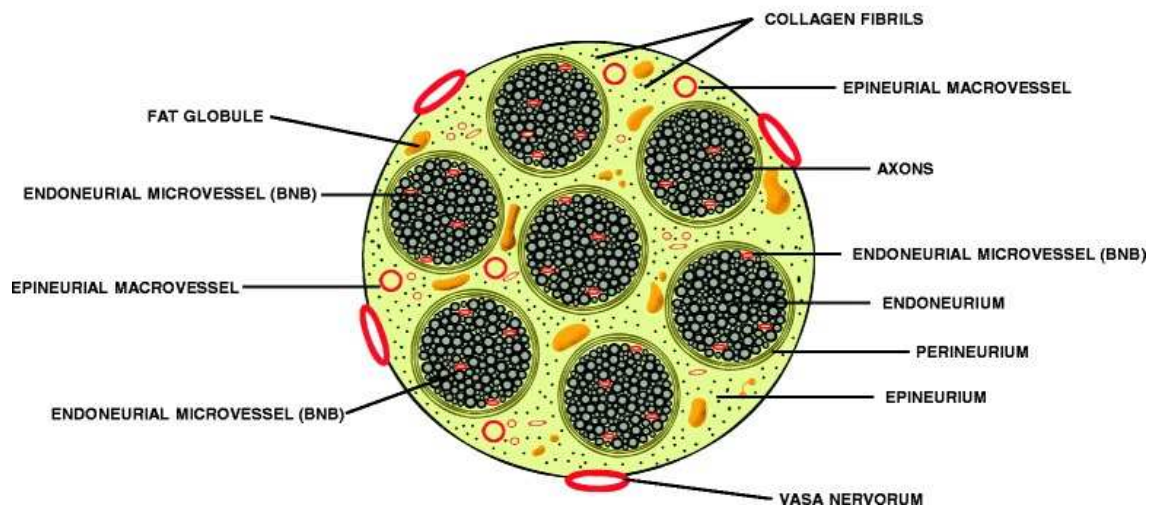


Figura 5. Localización de la BHN. Imagen modificada de Greathouse et al. 2016<sup>27</sup>.

Debido a su relativa impermeabilidad, aunque menor que la de la BHE, la BHN se encarga de proteger los nervios de potenciales componentes nocivos presentes en la circulación sanguínea, así como de evitar fluctuaciones de solutos que pudieran afectar su funcionalidad<sup>25</sup>. Es por esta razón que el SNP es considerado un sistema inmunoprivilegiado. Existen regiones del SNP más vulnerables que carecen de BHN. Es el caso de las raíces nerviosas, los ganglios raquídeos dorsales (GRD) o los terminales nerviosos<sup>28</sup>.

Alteraciones en la función de la BHN se han asociado con procesos inflamatorios y de desmielinización que afectan tanto a la estructura como a la funcionalidad nerviosa. El

síndrome de Guillain-Barré (SGB) y la poliradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP)<sup>29</sup> son ejemplos de patologías que cursan con un aumento de la permeabilidad de la BHN. En la neuritis alérgica experimental (EAN), el modelo animal del SGB, uno de los eventos iniciales que evidencian morfológicamente el desarrollo de la patología es precisamente la confirmación de la ruptura de la función barrera de la BHN, que precede a la presencia significativa de infiltrados inflamatorios perivasculares<sup>30,31</sup>.

Además de la BHN, en el control inmunológico del SNP participan una gran variedad de tipos celulares que en su conjunto componen un complejo sistema de vigilancia. Éste está comprendido por linfocitos T y linfocitos B, células presentadoras de antígenos (CPA) como los macrófagos y por las propias células de Schwann. Estas últimas pueden hacer de CPA y contribuyen en la función inmune<sup>31</sup>.

En la actualidad, el conocimiento de la regulación inmunológica del SNP humano es todavía muy limitado y la mayoría de la información proviene del estudio de modelos animales experimentales. El principal modelo de estudio se corresponde al modelo de EAN, el cual, con un curso monofásico, replica muchos de los aspectos clínicos y electrofisiológicos del SGB y puede obtenerse a partir de la inoculación de diversas fracciones de la mielina<sup>32</sup>. Las características histológicas observadas tanto en las fases más agudas como crónicas de este modelo, y su similitud a las observadas en el nervio periférico de pacientes con SGB y CIDP, han contribuido a atribuir un componente disimmune a la etiología de ambas enfermedades<sup>33</sup>. Adicionalmente, la efectividad de los tratamientos de elección en neuropatías inflamatorias (inmunoglobulinas endovenosas (IgIV), corticoesteroides y recambio plasmático) en el tratamiento de EAN, sugieren que éste es un buen modelo de estudio de la regulación inmunológica de estas enfermedades<sup>34-36</sup>.

### 1.1.4.1 INMUNIDAD CELULAR EN EL NERVI PERIFÉRICO

Estudios histológicos realizados en biopsias de pacientes con SGB y CIDP y en modelos animales, confirman la presencia de infiltrados inflamatorios perivasculares en el nervio periférico. Estos infiltrados, además de contener macrófagos, son ricos en linfocitos T activados<sup>37</sup>. En el nervio periférico, los linfocitos T representan una población heterogénea que incluye células T colaboradoras (CD4 positivas) y citotóxicas (CD8 positivas) con

ambos tipos de receptor de célula T (TCR),  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ . Tal y como pasa en la BHE, sólo las células T activadas ( pero no las *naïve*), tienen capacidad de atravesar la BHN<sup>31</sup>.

### 1.1.4.1.1 ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA T

---

La activación de la célula T *naïve* tiene lugar cuando el TCR de ésta reconoce a un antígeno afín presentado por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I o II expresados en la superficie de una CPA. Principalmente, aunque no de forma exclusiva, este papel lo llevan a cabo macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Generalmente, mediante las moléculas de MHC de tipo I, presentes en la superficie de la gran mayoría de células del organismo, se presentan péptidos de generalmente 8-9 aminoácidos de longitud de origen intracelular a las células T citotóxicas, CD8 positivas. Por contra, las moléculas de MHC de tipo II, con una expresión más restringida a CPA, presentan péptidos de mayor longitud (13-25 aminoácidos) de origen extracelular a las células T colaboradoras, CD4 positivas<sup>38</sup>. Los niveles de expresión en superficie de ambas moléculas de clase I y II pueden verse aumentados por citoquinas proinflamatorias, particularmente interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>31</sup>.

Además de la unión MHC-antígeno-TCR, la activación de las células T requiere de un segundo estímulo antígeno-independiente que proviene de la interacción entre moléculas de adhesión expresadas en la superficie de la CPA y la célula T<sup>38</sup>. En el modelo de EAN se ha descrito que este co-estímulo puede llevarse a cabo mediante una gran variedad de moléculas de adhesión, destacando las proteínas B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de las CPA, y sus ligandos activador (CD28) e inhibidor (CTLA4; CD152) de las células T<sup>39</sup>. A falta de co-estímulo, la célula T entra en estado de anergia o sufre apoptosis<sup>38</sup>. Esta segunda señal de co-estimulación antígeno-independiente es por tanto fundamental para la activación y la supervivencia de la célula T.

### 1.1.4.1.2 MIGRACIÓN TRANSENDOTELIAL

---

Una vez activados, los linfocitos T circulan por el torrente sanguíneo y ya en el SNP, se adhieren al endotelio vascular con el fin de atravesar la BHN en un proceso denominado migración transendotelial (TEM). Este proceso se inicia con una sobreexpresión de CAMs en la membrana de los leucocitos y de las propias células endoteliales, y está mediado por citoquinas proinflamatorias producidas, entre otros, por los macrófagos residentes en el

SNP tras su activación<sup>39</sup>. La expresión de CAMs de la familia de las selectinas (L-selectina, E-selectina) permite un primer contacto reversible entre las células T y el endotelio conocido como rodamiento. La unión irreversible entre éstos es posteriormente mediada por CAMs de la familia de las integrinas<sup>40</sup>. La interacción entre las integrinas VLA4 ( $\alpha 4\beta 1$ ; CD49d/CD29) y LFA1 ( $\alpha L\beta 2$ ; CD11a/CD18), expresadas en la superficie de las células T, y sus respectivos receptores de las células endoteliales, la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM1; CD106) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1; CD54), ha demostrado tener un papel relevante en la TEM de los leucocitos T en el modelo de EAN<sup>32</sup>. Tal y como pasa en el modelo murino de esclerosis múltiple, la interacción entre VLA4 y VCAM1 parece ser el actor más relevante en este proceso; pues el bloqueo de esta interacción mediante anticuerpos anti-VLA4 se traduce en una reducción de la desmielinización observada en este modelo<sup>39</sup>.

En la fase aguda de EAN, la sobreexpresión de ICAM1 y VCAM1 en las células endoteliales de los vasos anexos a las lesiones, se correlaciona con la clínica y el grado de infiltración de las mismas<sup>32</sup>. Adicionalmente, se han observado concentraciones elevadas de las formas solubles de VCAM1, ICAM1, L-selectina y E-selectina en el suero y el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con neuropatías inflamatorias<sup>31</sup>.

Tanto en EAN como en estos pacientes, además de las CAMs, en el proceso de TEM participan otras moléculas como las quimoquinas, citoquinas quimiotácticas como CXCL10, CCL2, CCL3 y CCL5, y las metaloproteinasas de matriz (MMP)<sup>39</sup>. Estas últimas son enzimas proteolíticas de origen leucocitario implicadas en la disrupción de la BHN. Se han reportado niveles elevados de MMP7 (matrilysin) y MMP9 (gelatinasa 92-kDa) en trastornos autoinmunes del SNP. La inhibición de estas MMP se ha asociado a un efecto beneficioso en la evolución de EAN<sup>39</sup>.

### 1.1.4.1.3 FUNCIÓN EFECTORA EN EL NERVIIO PERIFÉRICO

---

En el nervio periférico, las células predominantes en las lesiones observadas en la EAN y en pacientes con CIDP y SGB, son los macrófagos. Éstos pueden ser células propiamente residentes en el SNP o bien células derivadas de monocitos circulantes que han atravesado la BHN, y se encuentran tanto en las raíces espinales como en las regiones más distales del nervio periférico<sup>31</sup>. La depleción de esta población celular en EAN previene el desarrollo de signos clínicos, electrofisiológicos e histológicos en el modelo de SGB<sup>41</sup>. Los macrófagos son las células responsables de la reactivación de los linfocitos T en la fase

efectora de la enfermedad<sup>39</sup>. Además de su papel como principal CPA en EAN, los macrófagos desempeñan una acción fagocítica sobre la mielina y producen citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-23) y otros mediadores (MMP, radicales libres, óxido nítrico (ON), prostaglandinas) que perpetúan la respuesta inmune del organismo<sup>31,42</sup>. Una vez activadas, las células T amplían esta respuesta mediante la secreción de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17), moléculas de adhesión y MMP que intervienen en reclutamiento de macrófagos, la inducción de respuestas de tipo B o la disrupción de la BHN<sup>31</sup>. Algunas de estas moléculas pueden encontrarse elevadas en el suero y el LCR de los pacientes con neuropatías inflamatorias<sup>31</sup>.

### 1.1.4.1.4 TERMINACIÓN DE LA INFLAMACIÓN

Con el fin de limitar la inflamación en el nervio periférico, diversas moléculas reguladoras como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), y las interleucinas IL-10 e IL-35 participan en la terminación de la respuesta inflamatoria actuando sobre múltiples células diana en el sistema inmune<sup>31</sup>. A grandes rasgos, estas citoquinas inhiben la capacidad presentadora de antígeno de monocitos y células dendríticas, inhiben las respuestas inflamatorias de tipo CD8, Th1 y Th17, y estimulan las respuestas Th2 y la diferenciación de otras células con capacidad reguladora<sup>43</sup>. Los linfocitos T y B reguladores son ejemplos de estas células, aunque otras poblaciones como las células de Schwann y los macrófagos también tienen capacidad productora de IL-10. Los linfocitos T reguladores (Treg) son una subpoblación reducida de células T, cuyo fenotipo clásico (aunque no exclusivo) es CD4 y CD25 positivo y se caracteriza por expresar el factor de transcripción FoxP3<sup>44</sup>. Se han descrito frecuencias reducidas y alteraciones en la funcionalidad de esta población celular en múltiples enfermedades autoinmunes, incluyendo el SGB y la CIDP<sup>45,46</sup>. Estudios en modelos animales y en enfermedades autoinmunes indican que el tratamiento con IgIV, terapia de elección en neuropatías autoinmunes, aumenta la frecuencia y la capacidad supresora de las células Treg<sup>47</sup>. Adicionalmente, la administración directa de IL-10 en el modelo de EAN suprime la clínica de los individuos inoculados<sup>48</sup>, mientras que la depleción de Treg aumenta la severidad de ésta<sup>49</sup>; sugiriendo un rol importante de estos mecanismos en el contexto de un proceso inmunomediado.

Otro mecanismo destacado en la terminación de la inflamación es la apoptosis de las células T activadas, un proceso que transcurre de forma natural en el modelo monofásico



de EAN<sup>39</sup>. En este proceso intervienen células como los macrófagos y las células de Schwann, las cuales participan de la muerte celular programada mediante la secreción de mediadores como ON, lipocortinas, TNF- $\alpha$  o a través de la interacción Fas –FasL<sup>39,50</sup>. El tratamiento con corticoesteroides en el modelo de EAN, otra de las terapias de primera línea de las neuropatías inflamatorias, incluidas las paraneoplásicas, aumenta significativamente la apoptosis de las células T en el nervio afectado<sup>34</sup>. Esta noción pone de manifiesto la relevancia que presentan las células T tanto en la fase efectora como en la terminación de la inflamación en el SNP.

---

### 1.1.4.2 INMUNIDAD HUMORAL EN EL NERVI PERIFÉRICO

Si bien la inmunopatogenia de las neuropatías inflamatorias aún es parcialmente desconocida, con carácter general se les atribuye un importante componente humoral, hecho que está respaldado por la respuesta de estos pacientes a la plasmaféresis, las IgIV, y en algunos casos, a terapias depletivas de células B<sup>51</sup>. Otro hallazgo que contribuye a otorgarles este carácter es la pérdida de integridad de la BHN que se observa en modelos murinos tras la inmunización pasiva con suero de pacientes con SGB<sup>52</sup>.

#### 1.1.4.2.1 ANTICUERPOS

Tanto en pacientes con SGB como en la CIDP, se han reportado anticuerpos específicos contra gangliósidos y glucolípidos de membrana del nervio periférico, aunque su capacidad patogénica es en muchos casos controvertida<sup>51</sup>. En CIDP, se han detectado anticuerpos contra las proteínas de la mielina P0, P2 y PMP22 en algunos estudios, aunque su rol como potenciales antígenos no parece confirmado en otras cohortes<sup>53</sup>. Más recientemente, se han descrito anticuerpos contra diferentes moléculas de adhesión localizadas en el nodo y el paranodo de Ranvier en grupos reducidos de pacientes con CIDP<sup>17</sup>. Algunos de estos anticuerpos han demostrado ser patogénicos en modelos animales<sup>54,55</sup>. Finalmente, en los síndromes neurológicos paraneoplásicos (SNPs), la expresión ectópica de antígenos neurales por parte de un tumor conduce a la producción de anticuerpos paraneoplásicos u onconeuronales<sup>56</sup>. Estas observaciones contribuyen en la noción de que las células B participan en la inmunopatogenia de estas neuropatías, incluso en aquellos subtipos en los que los anticuerpos no se hayan demostrado claramente patogénicos como los síndromes paraneoplásicos clásicos.



En el SGB, está bien establecido que un proceso infeccioso provoca una reactividad cruzada contra el SNP. Este fenómeno se denomina mímica molecular, y se basa en la generación de células B autoreactivas como consecuencia de las similitudes estructurales entre los antígenos expresados por los microorganismos y el nervio periférico<sup>51</sup>. A diferencia del SGB, los procesos infecciosos raramente preceden al desarrollo de CIDP, reduciendo la probabilidad de que la mímica molecular explique la patología de estos pacientes<sup>50</sup>. Aun así, el carácter crónico y evolutivo de la enfermedad puede que contribuya a dificultar la identificación de estos desencadenantes<sup>47</sup>.

En los SNPs, se han descrito diversos antígenos tumorales implicados en la fisiopatología de estas enfermedades, siendo los anticuerpos anti Hu y anti Yo los más frecuentes<sup>57</sup>. En el SGB se han descrito múltiples microorganismos como *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae* y citomegalovirus que contienen secuencias de carbohidratos que coinciden con gangliósidos como GM1, GD1a, GM1b, GalNacGD1a, asialo-GM1, GQ1b y glicolípidos asociados<sup>58-60</sup>. Recientemente, el flavivirus del Zika se ha descrito como otro posible agente desencadenante de SGB como consecuencia de un proceso de mímica molecular<sup>47</sup>. En zonas endémicas, como la Polinesia Francesa o Brasil, no sólo se han detectado un aumento exponencial de los casos de SGB, sino que se ha observado una gran correlación entre los casos de SGB y una serología positiva para el virus<sup>61,62</sup>. Este fenómeno podría explicarse por el considerable solapamiento observado entre secuencias peptídicas del virus y de proteínas asociadas a la mielina humana<sup>63</sup>. Sin embargo, el antígeno responsable de la respuesta patogénica no está identificado.

En el SNP, los anticuerpos producidos por las células B pueden deteriorar la mielina mediante diversos mecanismos. En primer lugar, los anticuerpos pueden reconocer los antígenos diana y promover su internalización por los macrófagos. Asimismo, éstos también pueden dirigir la capacidad fagocítica de dichos macrófagos mediante su unión a receptores Fc de superficie. Por último, mediante la unión a su antígeno, los anticuerpos pueden activar la vía clásica del complemento<sup>64</sup>.

La identificación de los antígenos diana implicados en las neuropatías inflamatorias, y en las enfermedades autoinmunes en general, supone un paso crucial en la comprensión de su patogénesis. La detección de anticuerpos específicos para estas patologías,

independientemente de su capacidad patogénica, presenta una gran utilidad clínica incluso cuando su descripción se da en subgrupos de pacientes reducidos. El descubrimiento de estos autoanticuerpos proporciona biomarcadores que pueden ser útiles para el diagnóstico, el pronóstico y el manejo terapéutico de estos pacientes<sup>17</sup>. En el caso de los SNPs, dado que los síntomas neurológicos generalmente preceden a la detección del tumor<sup>65</sup>, el hallazgo de anticuerpos onconeuronales circulantes puede ser clave para orientar lo que a menudo es un diagnóstico difícil<sup>66</sup>. En algunos casos, su detección es clave en el descubrimiento de un cáncer subyacente, permitiendo el inicio un tratamiento oncológico temprano que a su vez podría contribuir al manejo de los SNPs<sup>67-70</sup>.

### 1.1.4.2.2 MECANISMOS ANTICUERPO-INDEPENDIENTES

Además de actuar como células precursoras de la producción de anticuerpos, las células B llevan a cabo funciones efectoras por mecanismos anticuerpo-independientes. Éstas participan de la activación y coestimulación de las células T, como CPA, mediante la expresión de moléculas MHC de tipo II, y actúan como productoras de citoquinas; principalmente IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, IL-16, TNF- $\alpha$  y las quimiocinas MIP1 $\alpha$  y MIP1 $\beta$ . Estos mediadores inflamatorios modulan la migración de células dendríticas, activan macrófagos, regulan las funciones efectoras de las células T y ejercen de bucle positivo para la activación de más células B<sup>64</sup>.

Subpoblaciones muy reducidas de células B, las denominadas células B reguladoras (Breg), participan en la terminación de la respuesta inflamatoria mediante la producción de TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-35. A diferencia de las células Treg, las células Breg no están definidas fenotípicamente, y se considera que diferentes poblaciones de células B pueden llegar a convertirse en Breg; es por ello que las Breg se definen exclusivamente por su competencia para producir IL-10<sup>43</sup>. Se han observado frecuencias de Breg alteradas en múltiples enfermedades autoinmunes<sup>71-73</sup>, y su depleción contribuye a exacerbar la clínica de algunos modelos experimentales como el de la esclerosis múltiple, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)<sup>74</sup>. Mientras que se ha reportado que el tratamiento con IgIV aumenta la frecuencia y la capacidad supresora de las células Treg<sup>75,76</sup>, su efecto sobre las Breg apenas ha sido estudiado. Muy recientemente, se ha descrito la asociación entre el aumento de las células de Bregs y la remisión clínica en un único caso de pénfigo tras el tratamiento con IgIV<sup>77</sup>. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio

indican que el tratamiento con IgIV aumenta la frecuencia de Breg en neuropatías inflamatorias, concretamente en la CIDP y en la neuropatía motora multifocal (NMM)<sup>78</sup>.

### 1.1.4.3 INMUNOCOMPETENCIA DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN

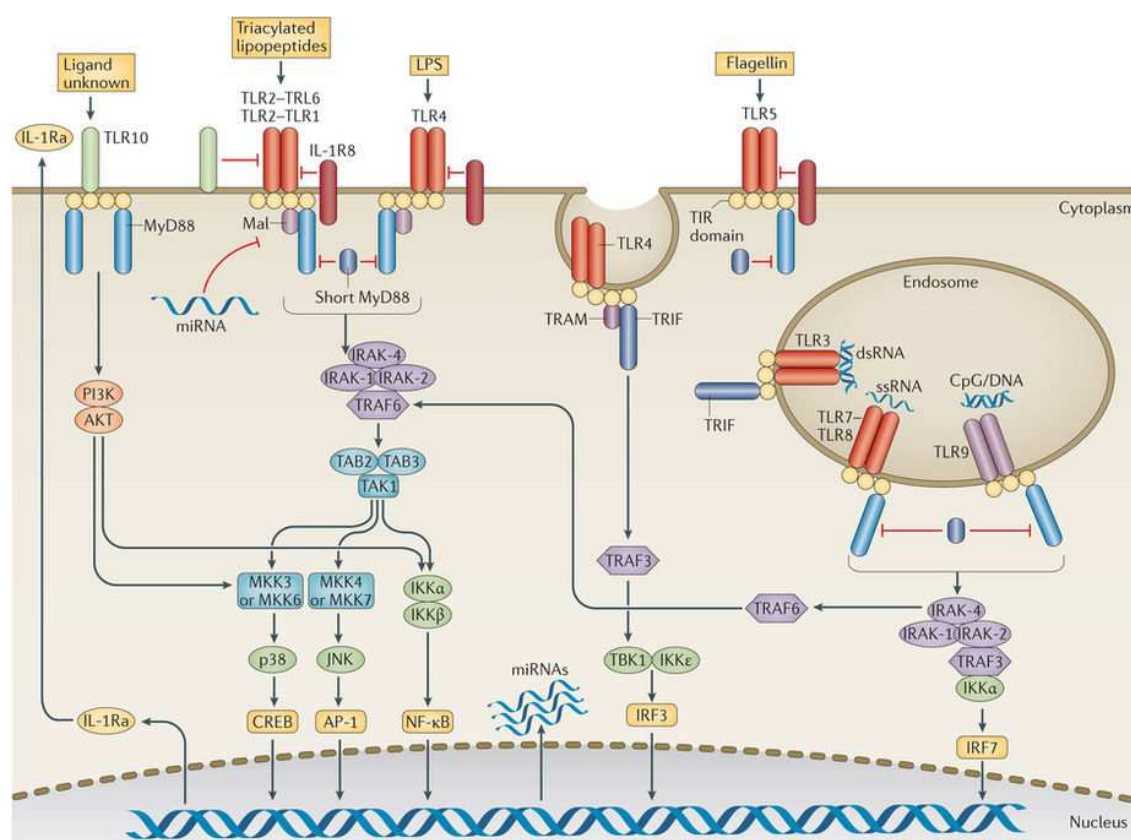
En el SNP, las células de Schwann son las células gliales encargadas del proceso de mielinización. Sin embargo, también se encargan de dar soporte trófico e intervienen en la regeneración del axón<sup>9,79,80</sup>. Adicionalmente, las células de Schwann participan de la respuesta inmune del SNP. A través de múltiples mecanismos, éstas intervienen en el reconocimiento y la presentación de antígenos; en la fase propiamente efectora de la respuesta inmune; y, finalmente, en la terminación de la inflamación<sup>81</sup>.

#### 1.1.4.3.1 RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS

Dada su capacidad de reconocimiento de antígenos, en el nervio periférico, las células de Schwann hacen de nexo de unión entre las dos ramas del sistema inmune; la inmunidad innata y la adquirida. Ante la invasión de un patógeno, estos dos sistemas se activan de forma secuencial. En primer lugar, se activa la respuesta innata, una respuesta rápida (activa en cuestión de horas) que tiene como objetivo reconocer de forma no-específica patrones conservados comunes a un gran número de microorganismos. Esta respuesta se da siempre con la misma intensidad independientemente del número de veces que el mismo antígeno es encontrado y consiste principalmente en la activación del complemento, de células con capacidad fagocítica (neutrófilos, monocitos y macrófagos) y de células Natural Killer. Tras la activación de la respuesta innata, se pone en marcha una respuesta mucho más específica y retardada (activa en cuestión de días) cuyo objetivo es la detección específica de cada antígeno. Esta respuesta es la denominada inmunidad adquirida, cuyas células efectoras principales son los linfocitos T y B<sup>38</sup>.

En lugar de basarse en la detección de cada antígeno concreto, la estrategia de la inmunidad innata se basa en la detección de patrones conservados en gran número de microorganismos. Estos patrones se corresponden a moléculas relevantes para la supervivencia o la patogenicidad de estos microorganismos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y son reconocidas por receptores reconocedores de patrones (PRRs) expresados en las células de la inmunidad innata<sup>82</sup>. Entre estos receptores, los más destacados son los receptores tipo Toll (TLRs), receptores

frecuentemente encontrados en las CPA que se han visto asociados al desarrollo de múltiples enfermedades. Hasta la fecha, se han descrito 10 tipos diferentes de TLR humanos capaces de detectar una gran variedad de PAMPs diferentes. Estos receptores pueden estar expresados tanto en la superficie celular como en la superficie de fagolisosomas (Figura 6). Por ejemplo, el receptor de superficie TLR4 puede detectar invasiones por bacterias gram-negativas con lipopolisacárido (LPS) en su membrana celular. Mientras que los receptores intracelulares TLR7 y TLR9 detectan ácido ribonucleico (ARN) monocatenario y ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena respectivamente<sup>83</sup>.



Nature Reviews | Rheumatology

Figura 6. Tipos de receptores tipo Toll humanos. Imagen extraída de Joosten et al. 2016<sup>84</sup>.

Las células de Schwann expresan de forma constitutiva TLR2 en su superficie celular, y en condiciones inflamatorias son capaces de expresar otros receptores como TLR3, TLR4, TLR6 y TLR7, hecho que las convierte en células capacitadas para el reconocimiento de antígenos<sup>81,85</sup>. El reconocimiento de LPS por parte de TLR4 activa la producción de quimiocinas, factores de crecimiento e inhibidores de proteasas implicadas en la activación del sistema inmune<sup>86</sup>. El reconocimiento de RNA viral de doble cadena mediante TLR3,

activa la vía de señalización inflamatoria mediada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>87</sup>. Este factor de transcripción se encuentra sobreexpresado en células T, macrófagos, células de Schwann y células endoteliales en EAN, resaltando su posible papel en la fisiopatología de las neuropatías inflamatorias<sup>88</sup>. De ahí que las células de Schwann se consideren nexo de unión entre la inmunidad innata y la adquirida.

### 1.1.4.3.2 REGULACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

---

Las células de Schwann también participan de la respuesta innata mediante la regulación de proteínas del complemento. El sistema del complemento es un conjunto de más de 20 proteínas circulantes que actúan de forma multifuncional. Éstas inducen la formación del complejo de ataque de membrana (MAC), opsonizan microorganismos para su digestión por fagocitos y actúan como quimioatrayentes. La activación del sistema de complemento se puede dar mediante la unión de la proteína C1q al complejo antígeno-anticuerpo (vía clásica o anticuerpo-dependiente), mediante la unión directa de componentes del complemento a patógenos (vía alternativa o anticuerpo-independiente) o mediante la unión de lectinas a los residuos de manosa de los microorganismos (vía de las lectinas)<sup>89</sup>. El sistema del complemento amplifica la respuesta inflamatoria, participa en el reclutamiento de macrófagos en el endoneuro y en la degradación directa de la mielina<sup>31</sup>. En las células de Schwann del modelo de EAN, se encuentran depósitos de MAC; compuesto por las proteínas C5b, C6, C7, C8 y C9 o C5b-9; en estadios previos a la lesión del nervio, sugiriendo un papel relevante del complemento en el proceso de desmielinización<sup>90</sup>. El bloqueo de C5 en este modelo previene la formación de MAC, y evita el daño neuronal y la muerte de células de Schwann<sup>91</sup>. También se encuentran depósitos de MAC en las células de Schwann de biopsias de pacientes con SGB<sup>92</sup>.

Las células de Schwann expresan los factores del complemento C1r, C1s y C3. La expresión de C3 está regulada positivamente por la propia célula de Schwann mediante la expresión de IL-1 inducida por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ <sup>93,94</sup>. El efecto de TNF- $\alpha$  sobre C3 en células de Schwann en pacientes con SGB, se ha demostrado con un aumento de depósitos de MAC y una reducción en la mielina en el nervio periférico de estos pacientes<sup>92</sup>. Las células de Schwann también ejercen funciones reguladoras sobre el complemento para atenuar su capacidad proinflamatoria y desmielinizante mediante la expresión de proteínas moduladoras. Ejemplos de estas moléculas son la protectina (CD59); que inhibe la

formación del MAC y se encuentra elevada en las células de Schwann de EAN<sup>95</sup>; o el receptor de complemento 1 (CR1, CD35); que impide la activación de las vías clásica y alternativa<sup>96</sup>. Otros ejemplos son la proteína de cofactor de membrana (MCP, CD46) y el factor acelerador del decaimiento (DAF, CD55), que inhiben las convertasas C3 y C5, amortiguando la activación del complemento<sup>94,97</sup>.

### 1.1.4.3.3 PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

---

Además de su papel en la inmunidad innata con el reconocimiento de antígenos y la modulación del sistema del complemento, en el nervio periférico, las células de Schwann pueden actuar como CPA. Constitutivamente, estas células expresan niveles bajos de moléculas de MHC de tipo I y carecen de expresión de moléculas de tipo II. Sin embargo, ante la presencia de linfocitos T activados, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , la expresión de ambas moléculas se ve potenciada<sup>98,99</sup>. En biopsias de nervio de pacientes con SGB y CIDP, las células de Schwann expresan MHC de clase II<sup>100,101</sup>. Estas células son capaces de procesar y presentar antígenos endógenos y exógenos *in vivo* e *in vitro* así como de expresar moléculas coestimuladoras esenciales para la presentación de antígeno, sugiriendo un posible papel como CPA en las neuropatías inflamatorias<sup>102</sup>. Algunos ejemplos de estas moléculas son BB-1, presente en células de Schwann de biopsias de nervio de pacientes con CIDP, y B7-1, presente en células de Schwann de biopsias de nervio de pacientes con SGB y CIDP<sup>102,103</sup>. Adicionalmente, la deficiencia del receptor de TNF- $\alpha$  en células de Schwann en el modelo de EAN, se traduce en una mejora clínica y en la reducción de la capacidad de presentación de antígenos como consecuencia de una disminución de B7-1 y MHC II, y en menor medida a CD40 y B7-2<sup>104</sup>. Estos datos resaltan la relevancia de la capacidad de presentar antígeno las células de Schwann en el contexto de las neuropatías inflamatorias.

### 1.1.4.3.4 FUNCIONES EFECTORAS

---

El papel inmunoefector de las células de Schwann se basa en la producción de una compleja red de citoquinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ), de las cuales se han descrito niveles elevados en el modelo de EAN y en SGB<sup>31,105</sup>. Al igual que las células T y los macrófagos, las células de Schwann liberan TNF- $\alpha$  como consecuencia de la activación de TLR4 en respuesta a LPS<sup>86</sup>. El TNF- $\alpha$  activa una cascada auto/paracrina sobre los receptores de TNF- $\alpha$  en las células de Schwann que induce la expresión de moléculas de adhesión

implicadas en el reclutamiento de células inmunes en el lugar de inflamación<sup>106</sup>. Esta cascada induce la producción de IL-1, cuya producción también está estimulada por el IFN- $\gamma$  producido por las células T. La secreción de IL-1 provoca la activación del receptor de IL-1 (IL-1R), que a su vez estimula la producción de TNF- $\alpha$ , generando un bucle de retroalimentación positivo que amplía la respuesta inflamatoria<sup>105</sup>. Mediante la producción de IL-6, las células de Schwann promueven la liberación del factor inhibidor de la leucemia (LIF) y la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), promoviendo la atracción de los macrófagos al nervio periférico inflamado<sup>107</sup>. Niveles de MCP-1 y de otras quemocinas como CXCL10 se encuentran elevados en el suero de los pacientes con SGB<sup>50,108</sup>. Las prostaglandinas E2, los tromboxanos A2 y los leucotrieno C4 son otros de los mediadores proinflamatorios que producen las células de Schwann<sup>109,110</sup>.

### 1.1.4.3.5 TERMINACIÓN DE LA INFLAMACIÓN

---

Las células de Schwann participan del proceso de regulación de la respuesta inflamatoria mediante diferentes mecanismos. Uno de los principales es la inducción de la apoptosis de las células T mediada por la unión Fas-FasL. Las células de Schwann no expresan Fas (CD95) o su ligando FasL constitutivamente. Sin embargo, las citocinas proinflamatorias Th1 pueden sobreexpresar ambas moléculas en la superficie de estas células<sup>111,112</sup>. La interacción entre Fas expresado en células T y FasL en células de Schwann promueve la apoptosis de los linfocitos T. En muestras de EAN y de pacientes con CIDP<sup>111,112</sup> se observan niveles elevados de FasL en células de Schwann. De la misma forma, la expresión de Fas en las células de Schwann podría hacerlas susceptibles al ataque de células T. La apoptosis de las células de Schwann es un fenómeno observable en EAN que puede contribuir a la desmielinización en el SNP<sup>113</sup>.

Otro de los mecanismos reguladores de las células de Schwann consiste en la producción de ON, un mediador con propiedades neurotóxicas e inmunosupresoras sobre las células T, que se produce mediante la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), una enzima inducida por citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ )<sup>114</sup>. La liberación de ON, aumenta la expresión del factor inducible por hipoxia 1(HIF-1) en las células de Schwann, estimulando la síntesis de eritropoyetina (Epo), un inhibidor de la proliferación de las células T y de la quimiotaxis de macrófagos<sup>115</sup>. El bloqueo de los receptores de Epo en el modelo de EAN se traduce en un empeoramiento clínico, mientras que el tratamiento con



Epo mejora el estado del nervio y reduce el número de macrófagos y de células CD4 positivas productoras de IFN- $\gamma$ ; sugiriendo un papel fundamental de esta vía en la regulación de la inflamación en neuropatías inmunomediadas<sup>116,117</sup>.

Igual que las células Treg y Breg anteriormente mencionadas, las células de Schwann tienen la capacidad de producir las citoquinas inmunoreguladoras IL-10 y TGF- $\beta$ <sup>118,119</sup>. Adicionalmente, estas células son capaces de amortiguar su propia respuesta mediante la expresión del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) y la disminución de la expresión de moléculas MHC de tipo II mediada por la activación del receptor de IL-6<sup>105</sup>. El inhibidor del factor de transcripción proinflamatorio NF- $\kappa$ B también se encuentra expresado de forma abundante en las células de Schwann<sup>120</sup>.

En conclusión, además de mielinizar y dar soporte al axón, las células de Schwann llevan a cabo un papel activo en la respuesta inmune en el SNP a través de múltiples mecanismos. Adicionalmente, estudios recientes demuestran una disminución de la capacidad proregenerativa del axón de las células de Schwann en pacientes con CIDP, remarcando la relevancia de esta población celular en el desarrollo de patologías inmunomediadas en el nervio periférico<sup>121</sup>.

## 1.2 NEUROPATÍAS AUTOINMUNES

### 1.2.1 INTRODUCCIÓN

Las neuropatías autoinmunes, también conocidas como neuropatías inflamatorias, son un grupo heterogéneo de trastornos raros y adquiridos caracterizados por la desmielinización y degeneración axonal de nervios periféricos y raíces nerviosas. Aunque los mecanismos subyacentes a la fisiopatología de estas enfermedades siguen siendo parcialmente conocidos, se asume un componente autoinmune dada la respuesta clínica de estos pacientes a terapias inmunomoduladoras e inmunosupresoras<sup>122</sup>.

Clásicamente, las neuropatías autoinmunes abarcan una forma aguda, el SGB, en todas sus variantes, y varias formas crónicas, como la CIDP, la NMM y la polineuropatía asociada a gammapatía monoclonal de significado incierto IgM (MGUSP)<sup>123</sup>. Aunque su etiología es radicalmente diferente y generalmente se asocia a la presencia de un proceso canceroso, dentro de las neuropatías autoinmunes también se pueden incluir las neuropatías



paraneoplásicas<sup>56</sup>. Éstas son, junto con la CIDP, las entidades clínicas en las que se centra esta tesis.

## 1.2.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS NEUROPATÍAS AUTOINMUNES

### 1.2.2.1 POLIRADICULONEUROPATÍA DESMIELINIZANTE INFLAMATORIA CRÓNICA (CIDP)

La CIDP es un síndrome inflamatorio crónico que engloba múltiples variantes clínicas cuya naturaleza suele ser lentamente progresiva o recurrente-remitente<sup>124</sup>. Aunque la CIDP es la neuropatía autoinmune crónica más frecuente, ésta sigue siendo una enfermedad rara cuya prevalencia oscila entre 1 y 9 casos por cada 100.000 habitantes<sup>125,126</sup>.

Clínicamente, las variantes de CIDP incluyen en una forma típica o clásica que engloba hasta el 75% de los pacientes y varias formas atípicas<sup>127</sup> (Tabla 2). La forma clásica de CIDP se define como un trastorno sensitivo/motor simétrico de instauración subaguda o crónica que cursa con debilidad proximal y distal y arreflexia<sup>124</sup>. En algunos de estos pacientes se puede observar afectación de pares craneales o afectación del SNC concomitante, aunque estos síntomas se dan de forma infrecuente<sup>58,128</sup>.

#### **Variantes de CIDP**

CIDP típica

CIDP atípica

CIDP motora pura

CIDP atáxica pura

CIDP sensitiva pura

Variante distal: distal adquirida desmielinizante simétrica (DADS)

Variante asimétrica: multifocal adquirida desmielinizante sensitiva y motora (MADSAM) o síndrome de Lewis–Sumner

CIDP CNTN1 positiva

CIDP NF155 positiva

Tabla 2. Variantes de CIDP. Tabla modificada de Lewis 2017<sup>124</sup>.

Los casos atípicos de CIDP incluyen formas motoras y atáxicas puras, formas predominantemente sensitivas o sensitivas puras, formas asimétricas o focales con

bloqueos en la conducción persistentes (Síndrome de Lewis-Sumner) y casos con signos y síntomas predominantemente distales (variante DADS)<sup>124</sup>. Al igual que en la variante clásica de la CIDP, algunos pacientes con formas atípicas también pueden presentar afectación del SNC<sup>128</sup>.

En los últimos años, se han incluido dos nuevos fenotipos dentro de las formas atípicas de CIDP; las variantes con anticuerpos contra las moléculas de adhesión celular paranodales CNTN1 y NF155, también conocidas como nodopatías o nodo-paranodopatías. Estas variantes, que se corresponden a grupos muy reducidos de pacientes, son las primeras formas reportadas que demuestran la presencia de autoanticuerpos asociados a características clínicas muy concretas en la CIDP. Los pacientes con anticuerpos anti-CNTN1, generalmente de edad avanzada, presentan un debut agudo y agresivo y un predominio motor<sup>129</sup>. Los pacientes con anticuerpos anti-NF155 debutan a una edad temprana, tienen un predominio distal y generalmente más sensitivo y presentan temblores y ataxia con implicación cerebelosa<sup>130</sup>. También se han descrito anticuerpos contra CASPR1 en dos pacientes con neuropatías inflamatorias, uno con SGB y otro con CIDP, ambos pacientes con dolor neuropático y sin anticuerpos contra CNTN1 o NF155<sup>131</sup>. Los pacientes con CIDP y anticuerpos anti-CNTN1, anti-CASPR1 y anti-NF155 se caracterizan por presentar autoanticuerpos de la subclase IgG4, los cuales se distinguen por su incapacidad de fijar complemento y de unirse a receptores de inmunoglobulinas. Adicionalmente, estos pacientes presentan una respuesta pobre al tratamiento con IgIV. Por contra, éstos presentan una excelente respuesta a terapias de depleción de linfocitos B, como es el caso del anticuerpo monoclonal anti-CD20 o rituximab<sup>129-131</sup>.

Más recientemente, se ha descrito la presencia de anticuerpos contra las formas nodales de la neurofascina, los denominados anticuerpos anti-NF140/NF186, en 5 pacientes con CIDP<sup>132</sup>. Estos anticuerpos, predominantemente de la subclase IgG4 (4/5) no fijan complemento. Sin embargo, a diferencia de los pacientes con anticuerpos anti-CNTN1, anti-CASPR1 y anti-NF155, la mayoría (3/5) de los pacientes con anticuerpos anti-NF140/NF186, responden a IgIV y esteroides, no presentan temblor o dolor neuropático y presentan trastornos autoinmunes concomitantes (4/5). A grandes rasgos, estos pacientes presentan un debut subagudo (4/5) y severo que se asocia a ataxia sensitiva (4/5), bloqueos en la conducción (3/5) y afectación craneal (2/5). En dos de esos pacientes, la

negativización de los autoanticuerpos anti-NF140/NF186 correlacionó con la remisión clínica, sugiriendo un papel relevante de éstos en el desarrollo de la neuropatía.

La mayoría de los pacientes con CIDP debutan con un curso crónico progresivo o recurrente-remitente de más de 8 semanas, aunque existe hasta un 16% de pacientes que lo hacen con un curso agudo semejante al del SGB<sup>133</sup>. En estos pacientes, que suelen debutar con síntomas sensitivos prominentes, el diagnóstico de CIDP se debe sospechar si la clínica perdura más de dos meses o si se observan fluctuaciones tras tres o más tratamientos<sup>133</sup>. Además de esta variabilidad en la progresión de la enfermedad, algunas CIDP presentan rasgos clínicos (afectación craneal) o paraclínicos (gammapatía monoclonal IgG o IgA) distintivos que amplían el espectro de esta enfermedad<sup>128</sup>.

Dada la heterogeneidad de sus variantes, la CIDP es un trastorno de diagnóstico complejo basado en una combinación de parámetros clínicos, electrofisiológicos y de laboratorio<sup>134,135</sup>. Según los criterios diagnósticos de la European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society (EFNS/PNS), el electromiograma (EMG) es un elemento diagnóstico fundamental que permite estratificar los casos de CIDP en tres grados de certeza diagnóstica: definitiva, probable o posible<sup>134</sup>. En el EMG de los pacientes con CIDP es típico observar enlentecimiento de la velocidad de conducción motora, dispersión temporal de los potenciales evocados motores o bloqueos de la conducción motora. Otras pruebas que pueden contribuir a dicho diagnóstico son la presencia de disociación albúmino-citológica en el LCR, el agrandamiento de las raíces nerviosas observado por resonancia electromagnética y la evidencia objetiva de respuesta a los tratamientos anti-inflamatorios, inmunomoduladores o inmunosupresores<sup>134</sup>. Si bien la biopsia de nervio, sural generalmente, puede llegar a aportar información diagnóstica, la presencia o la ausencia de anomalías en ésta no es suficiente para confirmar o excluir el diagnóstico de CIDP<sup>136</sup>.

Más recientemente, la determinación de marcadores serológicos como los autoanticuerpos anti-CNTN1 y anti-NF155 mediante técnicas de inmunodetección, amplía la batería de pruebas diagnósticas que junto con la evaluación clínica y electrofisiológica permiten la confirmación de un diagnóstico de CIDP. La detección de estos anticuerpos, que generalmente se solicita en pacientes que no responden a los tratamientos habituales o que

presentan una clínica concreta, tiene una gran relevancia clínica tanto para el diagnóstico como para el seguimiento, la prognosis y el manejo de la CIDP de estos pacientes<sup>17</sup>. A pesar de su pobre respuesta a IgIV, los pacientes anti-CNTN1 y anti-NF155 positivos presentan una buena respuesta a terapias depletivas de células B<sup>129,130,137</sup>. El uso de estas terapias puede llegar a prevenir lesiones nerviosas irreversibles y en consecuencia mejorar la prognosis de estos pacientes.

La amplia variedad de criterios diagnósticos para CIDP, junto con la posibilidad de estratificar los casos en definitivos, probables o posibles en función del perfil clínico y electrofisiológico de cada paciente, hace que el diagnóstico de CIDP sea complejo, frecuentemente ineficaz<sup>138</sup> y que resulte en una entidad altamente heterogénea<sup>134,139</sup>. Como consecuencia de ello, dentro del síndrome CIDP, se incluyen una gran variedad de fenotipos con características clínicas muy diversas<sup>134,135</sup>.

El tratamiento de las neuropatías inmunomediadas del SNP persigue reducir la inflamación y la desmielinización; prevenir lesiones axonales primarias y secundarias y mejorar principalmente la fuerza y la capacidad funcional de estos pacientes<sup>32,140</sup>. Según la guía terapéutica de la EFNS/PNS, el manejo de la CIDP se basa principalmente en el uso clínico de tres tratamientos de primera línea: los corticoesteroides orales o en pulsos endovenosos, las IgIV y la plasmaféresis o recambio plasmático. El tratamiento de la CIDP está indicado en aquellos pacientes con una afectación moderada o severa, cuyos síntomas generan un impacto en la vida diaria y éste debe adaptarse al perfil de cada paciente, siendo las posibles contraindicaciones que éste presente las que determinen la terapia de inicio<sup>134</sup>. Generalmente, las opciones terapéuticas más usadas son en primer lugar las IgIV y en segundo término los corticoesteroides<sup>31,141,142</sup>. La plasmaféresis es una estrategia altamente efectiva en una gran variedad de pacientes, reforzando el posible rol patogénico de los autoanticuerpos en esta enfermedad; sin embargo su uso como terapia de mantenimiento se ve limitado por su menor tolerancia y por la mayor frecuencia de reacciones adversas asociadas<sup>134,143</sup>. Independientemente del tratamiento de elección inicial, la monitorización de estos pacientes es clave en el manejo de la CIDP, tanto para evitar un deterioro por falta de respuesta como una posible sobremedicación. En el caso de los corticoesteroides, tras 12 semanas de tratamiento con una respuesta favorable se recomienda reducir la dosis paulatinamente durante 1 o 2 años hasta niveles de mantenimiento, momento en el que se podrá valorar la retirada de los mismos. En el caso de las IgIV, hasta un 15%-30% de los

pacientes de CIDP necesitan una única infusión para minimizar sus síntomas. En aquellos casos en los que es necesario más de un curso de IgIV, la dosis y la frecuencia de administración deberán adaptarse a las necesidades de cada paciente<sup>134</sup>.

Otros tratamientos inmunosupresores como la ciclosporina, la ciclofosfamida, el metotrexato, la azatioprina y el micofenolato de mofetilo se consideran opciones de segunda línea para el tratamiento de la CIDP, a pesar de la escasa evidencia que en algunos casos los avala<sup>144</sup>. Su uso se restringe a aquellos pacientes refractarios a las opciones terapéuticas de elección o bien como tratamiento añadido a éstas, en aquellos pacientes tratados a dosis altas como medida para reducir los posibles efectos adversos derivados de dichas dosis<sup>134</sup>.

En pacientes con anticuerpos anti-CNTN1 y anti-NF155 de la subclase IgG4, el uso de terapias depletivas de células B como el rituximab, ha demostrado ser efectivo para el tratamiento de aquellos casos que no presentan respuesta a los tratamientos de elección<sup>137</sup>. La respuesta de estos pacientes al rituximab suele ser de larga duración y se correlaciona con una disminución de los títulos de autoanticuerpos, los cuales pueden llegar a negativizarse en algunos casos<sup>137</sup>. Esta respuesta es similar a la observada en pacientes sin CIDP con otras patologías mediadas por autoanticuerpos patogénicos de la subclase IgG4<sup>145,146</sup>.

### 1.2.2.2 NEUROPATÍAS PARANEOPLÁSICAS

Las neuropatías paraneoplásicas son neuropatías inmunomediadas raras que se incluyen dentro de los SNPs, un conjunto heterogéneo de trastornos neurológicos de origen autoinmune asociados a la presencia de un tumor. En la actualidad, aunque se desconoce la fisiopatogenia de estas enfermedades de forma precisa, se considera que los SNPs aparecen al generarse una pérdida de la tolerancia inmunológica en un tejido neoplásico en el que, la expresión ectópica de antígenos neurales por parte de un tumor, conduce a la producción de los llamados anticuerpos paraneoplásicos u onconeuronales<sup>56</sup>. De esta forma, se excluyen como SNPs aquellas manifestaciones neurológicas que pudieran ser explicadas por la invasión directa del tumor primario o sus metástasis sobre el sistema nervioso. Tampoco se consideran SNPs las manifestaciones neurológicas causadas por posibles complicaciones derivadas del cáncer; cerebrovasculares, infecciosas o toxiconutricionales; o por cualquier tipo de terapia antitumoral, incluida la cirugía<sup>147</sup>.

Los SNPs son afectaciones muy poco frecuentes en la práctica clínica diaria cuya prevalencia varía en función del tipo de síndrome y de tumor. Se estima que menos del 1% de los pacientes con cáncer desarrollan un SNPs, siendo éstos más comunes en el cáncer de pulmón microcítico o de células pequeñas (CPCP), el timoma, el cáncer de ovario y de mama, el linfoma de Hodgkin y los mielomas<sup>148</sup>.

Los SNPs comprenden múltiples entidades clínicas que pueden afectar a todo sistema nervioso, tanto al SNC como al SNP e incluso al músculo o la unión neuromuscular<sup>56</sup>. Aunque la gran mayoría de los SNPs tengan su origen en el SNC, según la base de datos de la *Euronetwork* en SNPs, un tercio de los pacientes con SNPs tienen el SNP como el lugar de afectación primario<sup>57</sup>. Entre los SNPs periféricos, la neuronopatía sensitiva subaguda (SSN) es el síndrome más frecuente<sup>57</sup>. Además de clasificarse según su lugar de afectación, los SNPs pueden dividirse en síndromes clásicos y no clásicos<sup>66</sup>. Dentro de las formas clásicas se encuentran aquellos síndromes neurológicos que se asocian muy frecuentemente con un cáncer, como por ejemplo la encefalitis límbica, en el SNC, o la SSN, en el SNP. Si bien la confirmación como SNPs de cualquiera de estos trastornos requiere la valoración y la exclusión de otros posibles diagnósticos diferenciales, su detección debe relacionarse rápidamente con la sospecha de un tumor oculto. Los síndromes no clásicos, a diferencia de los anteriores, son trastornos neurológicos que pueden darse a raíz de un proceso tumoral, aunque característicamente éstos se dan de forma totalmente independiente. Un ejemplo de síndrome no clásico sería el SGB en el SNP<sup>66</sup> (Tabla 3).

Independientemente del tipo de síndrome, clásico o no clásico, el diagnóstico de los SNPs es un proceso complejo donde existe el riesgo de considerar como neoplásico cualquier síndrome neurológico que se presente de forma concomitante a un cáncer; sin que exista ninguna relación en la patogenia de ambas enfermedades<sup>66</sup>. La detección de anticuerpos onconeuronales en el suero y el LCR de estos pacientes, puede ser clave para orientar lo que a menudo es un diagnóstico difícil<sup>66</sup>. Adicionalmente, dado que los síntomas neurológicos generalmente preceden a la detección del tumor<sup>65</sup>, en los SNPs, el hallazgo de anticuerpos onconeuronales en pacientes es en algunos casos clave en el descubrimiento de un cáncer subyacente, permitiendo la iniciación de un tratamiento oncológico temprano que a su vez podría contribuir al manejo de los SNPs<sup>67-70</sup>. El diagnóstico de estos

síndromes suele comportar el descubrimiento de un tumor de tamaño reducido con posibilidades de éxito terapéutico<sup>149,150</sup>.

	<b>Síndromes clásicos</b>	<b>Síndromes no-clásicos</b>
<b>SNC</b>	Encefalomiелitis	Encefalitis de tronco
	Encefalitis límbica	Neuritis óptica
	Degeneración cerebelosa	Retinopatía asociada a cáncer
	Opsoclonus-Mioclonus	Retinopatía asociada a melanoma
		Síndrome de la persona rígida
		Mielopatía Necrotizante
		Enfermedad de motoneurona
<b>SNP</b>	Neuronopatía sensitiva subaguda	Neuropatía sensitivomotora aguda: SGB y neuritis braquial
	Pseudoobstrucción gastrointestinal crónica	Neuropatía sensitivomotora subaguda/crónica
		Neuropatía y paraproteinemia
		Neuropatía y vasculitis
		Pandisautonomía aguda
<b>Unión Neuromuscular y músculo</b>	Síndrome de Eaton-Lambert	Miastenia gravis
	Dermatomiositis	Neuromiotonía adquirida
		Miopatía necrotizante aguda

Tabla 3. Tipos de Síndromes Neurológicos Paraneoplásicos. Tabla modificada de Graus et al. 2004<sup>66</sup>.

Hasta la fecha, a pesar de los esfuerzos que caracterizan parcialmente otras entidades antigénicas, se han descrito diez anticuerpos onconeuronales bien caracterizados contra antígenos intracelulares que incluyen: los anticuerpos anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, anti-CV2/CRMP5, anti-Ta/Ma2, anti-anfifisina y más recientemente los anticuerpos anti-Tr, anti-SOX1, anti-recoverina y anti-GAD<sup>66,151</sup>. Entre éstos, los anticuerpos anti Hu y anti Yo son los más frecuentemente detectados en los pacientes con SNPs<sup>57</sup>. A excepción de los anticuerpos anti-Hu y anti-CV2/CRMP5, que se asocian con la SSN, la mayoría de estos anticuerpos onconeuronales se asocian con trastornos del SNC. Además de los anticuerpos onconeuronales contra antígenos intracelulares, en los SNPs se han descrito anticuerpos



contra antígenos sinápticos y de membrana. Si bien estos anticuerpos no se incluyen dentro de los denominados anticuerpos onconeuronales bien caracterizados, estos anticuerpos se asocian a múltiples síndromes neurológicos<sup>152,153</sup>. Entre ellos cabe destacar los anticuerpos contra canales de calcio (anti-VGCC) y los anticuerpos anti-CASPR2, ambos asociados a afectaciones del SNP.

A pesar de la gran relevancia clínica de los anticuerpos paraneoplásicos, el 50% de los SNPs pueden cursar sin la detección de éstos, e inversamente, anticuerpos paraneoplásicos circulantes, a títulos bajos generalmente, pueden detectarse en ausencia de un síndrome neurológico<sup>148</sup>. Por ejemplo, los anticuerpos anti-Hu y anti-CV2/CRMP5 se detectan en un 20 y un 10%, respectivamente, de los pacientes con CPCP sin afectación neurológica<sup>154</sup>. Los anticuerpos anti-Ri o anti-Yo también se detectan en más del 4% de los pacientes con cáncer de ovario sin asociarse a un síndrome neurológico<sup>155</sup>. Como consecuencia, la presencia de anticuerpos onconeuronales no es la única condición para definir un síndrome neurológico como paraneoplásico. Los criterios diagnósticos recomendados para los SNPs sugieren basar el diagnóstico en tres aspectos fundamentales: la presencia o ausencia de cáncer, la definición del síndrome neurológico como clásico o no clásico y la detección (o falta de detección) de anticuerpos onconeuronales. En base a estos tres aspectos, el diagnóstico de SNPs se efectúa con dos grados de evidencia: se puede hablar de SNPs definidos o SNPs posibles<sup>66</sup>. Dentro de los casos de SNPs definidos se incluyen los siguientes supuestos: (1) síndrome clásico con tumor desarrollado dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico del síndrome neurológico, independientemente de si hay o no anticuerpos; (2) síndrome clásico o no clásico sin tumor con anticuerpos onconeuronales bien caracterizados; (3) síndrome no clásico con tumor desarrollado dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico del síndrome neurológico con anticuerpos onconeuronales, independientemente de si están o no bien caracterizados; (4) síndrome no clásico con tumor que se resuelve o mejora tras el tratamiento oncológico, sin inmunoterapia concomitante. Como casos de SNPs posibles se incluyen: (1) síndrome clásico sin tumor ni anticuerpos onconeuronales de ninguna clase pero con alto riesgo de presentar un tumor; (2) síndrome clásico o no clásico sin tumor con anticuerpos onconeuronales parcialmente caracterizados; (3) síndrome no clásico con tumor desarrollado en los dos años posteriores al diagnóstico del síndrome neurológico sin anticuerpos onconeuronales de ninguna clase<sup>66</sup> (Figura 7).

En los SNPs, los síntomas neurológicos generalmente preceden a la detección del tumor, aunque en algunas ocasiones éstos aparecen cuando el tumor ya es conocido, frecuentemente en el contexto de una recidiva<sup>65,148</sup>. La aparición de los síntomas suele ser subaguda con una progresión que puede estabilizarse en cuestión de semanas o meses, causando una incapacidad grave que puede llegar a terminar con la vida del paciente<sup>65,156</sup>.

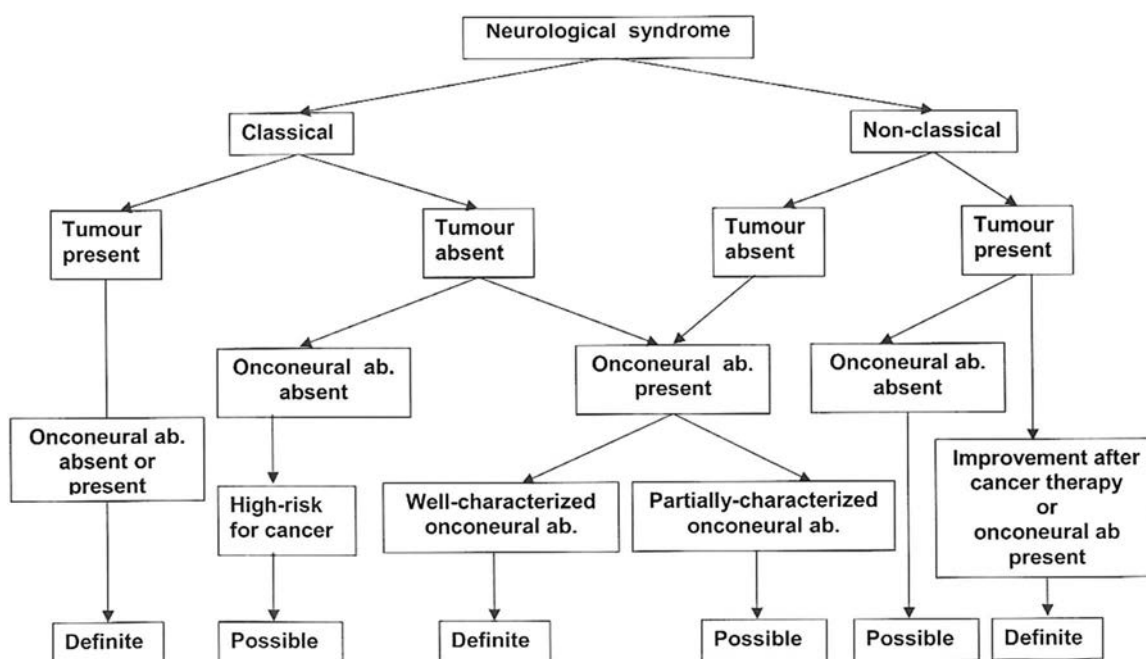


Figura 7. Algoritmo diagnóstico de los Síndromes Neurológicos Paraneoplásicos. Imagen extraída de Graus et al. 2004<sup>66</sup>.

De entre las múltiples neuropatías consideradas como paraneoplásicas, sólo la SSN se considera un síndrome clásico<sup>66</sup>. El resto de neuropatías; sensitivomotoras, motoras puras, vasculíticas y desmielinizantes; son síndromes no clásicos con una incidencia mucho más reducida<sup>157</sup>. La SSN es un trastorno grave de evolución rápida y progresiva causada por la afectación del soma de las neuronas sensitivas de los GRD<sup>158</sup>. La clínica de estos pacientes suele ser multifocal o asimétrica y consiste en parestias y dolor radicular que afectan tanto a extremidades superiores como inferiores, pudiendo también afectar a cara, pecho y abdomen. Estos pacientes también suelen sufrir de arreflexia y de ataxia sensitiva<sup>159,160</sup>. El análisis del LCR puede mostrar una concentración elevada de proteínas, pleocitosis y, ocasionalmente, bandas oligoclonales<sup>159</sup>. Electrofisiológicamente, los potenciales de acción de los nervios sensitivos presentan amplitudes disminuidas o ausentes. Las velocidades de conducción motoras pueden modificarse levemente, aunque generalmente son normales<sup>161</sup>.

Más del 86% de los pacientes con anticuerpos anti-Hu presentan SSN, siendo ésta la neuropatía más común dentro del síndrome anti-Hu<sup>162</sup>; sin embargo sólo el 24% de estos pacientes la presentan de forma exclusiva, el resto la presentan junto con otras alteraciones del SNP o del SNC<sup>156</sup>. Aunque se ha reportado en casos de cáncer de mama, cáncer de ovario, sarcoma y enfermedad de Hodgkin<sup>163,164</sup>, el 70-80% de los casos de SSN se asocian con CPCP; la mayoría de ellos con anticuerpos anti-Hu<sup>156,165</sup>. Sin embargo, pequeños subconjuntos de estos pacientes pueden presentar anticuerpos anti-anfifisina o anti-CV2/CRMP5 (con o sin anticuerpos anti-Hu) o ningún anticuerpo conocido<sup>166</sup>. En pacientes con anticuerpos anti-CV2/CRMP5, la SSN se puede presentar como un trastorno sensitivo o sensitivomotor que afecta principalmente a las extremidades inferiores, con un EMG con patrón axonal o axonal y desmielinizante. Estos pacientes también suelen presentar alteraciones del SNC<sup>167</sup>.

El tratamiento general de los SNPs se lleva a cabo mediante dos estrategias estrechamente relacionadas con el mecanismo fisiopatológico hipotetizado en el desarrollo de estas enfermedades. Estas estrategias abarcan, en primer lugar, el tratamiento del cáncer; que busca paliar la expresión ectópica de antígenos neurales; y en segundo lugar, el uso de inmunoterapias; utilizadas para el manejo del síndrome neurológico<sup>168</sup>.

La detección y el subsiguiente tratamiento del tumor es un paso fundamental en el manejo de estos pacientes, ya que se ha descrito que el tratamiento precoz del cáncer (con cirugía, radioterapia, quimioterapia o terapias biológicas antitumorales) es el enfoque con mayor posibilidad de estabilización o mejoría del cuadro neurológico en los SNPs<sup>156,169</sup>. Aun así, no todos los síndromes neurológicos mejoran tras el tratamiento oncológico; la respuesta clínica varía en función del síndrome y de los anticuerpos onconeuronales asociados a éste. Un ejemplo sería la degeneración cerebelosa asociada a anticuerpos anti-Yo, cuya evolución empeora a pesar del tratamiento oncológico<sup>170</sup>.

Aunque existen recomendaciones para el tratamiento de algunos síndromes neurológicos clásicos, no existen protocolos establecidos para el manejo de la mayoría de los SNPs<sup>56,67</sup>. Adicionalmente, debido a la baja incidencia de estas enfermedades, la evidencia de la eficacia de los tratamientos de estas patologías es muy escasa y se basa en estudios de casos aislados o series cortas de pacientes<sup>171</sup>.

La inmunoterapia no es efectiva para la mayoría de los SNPs. Sin embargo, su uso en estos trastornos se ve alentado por el origen autoinmune de estas enfermedades y por los informes de casos aislados que describen respuestas favorables a diversas intervenciones inmunoterapéuticas<sup>172-174</sup>. Los tratamientos inmunomoduladores utilizados en los SNPs incluyen el recambio plasmático, la inmuoadsorción con columnas de proteína A y el uso, aislado o en combinación, de corticoesteroides, IgIV, ciclofosfamida, azatioprina, tacrolimus o rituximab<sup>148,171</sup>. En los SNPs, la respuesta a estos tratamientos es síndrome y anticuerpo-dependiente, siendo ésta más destacable en el síndrome de Eaton-Lambert y la neuromiotonía<sup>175</sup>. Por el contrario, de forma generalizada, la respuesta a estas terapias de los síndromes del SNC con anticuerpos onconeuronales y en la SSN, en el SNP, suele ser escasa; exceptuando algunos casos en los que se puede conseguir una estabilización clínica como consecuencia de un tratamiento precoz<sup>176</sup>.

---

### 1.2.3 INMUNOPATOGENIA DE LAS NEUROPATÍAS AUTOINMUNES

---

#### 1.2.3.1 INMUNOPATOGENIA DE LA CIDP

---

##### 1.2.3.1.1 HISTOPATOLOGÍA

---

Aunque no hay marcadores considerados suficientemente específicos como para diagnosticar la CIDP en la biopsia del nervio<sup>50</sup>, las características neuropatológicas clásicas de la CIDP se basan en observaciones realizadas, predominantemente, en el nervio sural de estos pacientes<sup>177-179</sup>. Más recientemente, debido a su mayor accesibilidad, la biopsia de piel está emergiendo como una herramienta útil en el estudio fibras nerviosas intradérmicas; no sólo en neuropatías inflamatorias sino también en otras enfermedades como la neuropatía diabética<sup>51</sup>. La inmunopatogenia de la CIDP aún no se ha dilucidado, aunque las observaciones en nervios humanos y en modelos animales implican alteraciones tanto en la inmunidad celular como en la humoral<sup>180</sup>.

Aunque menos acusados que en el SGB, en el nervio periférico y las raíces nerviosas de los pacientes con CIDP es común observar infiltrados inflamatorios endoneurales y perivasculares, con o sin edema, predominantemente formados por macrófagos y en menor medida por células T. Otro de los rasgos característicos de la biopsia de estos pacientes es la pérdida de densidad axonal, así como la observación de ovoides de mielina, indicativos de degeneración axonal secundaria, y de lesiones en bulbo de cebolla, indicativas de procesos de desmielinización y remielinización<sup>2,50</sup>. Los depósitos de complemento y de

inmunoglobulinas también son frecuentemente observados en el nervio periférico de los pacientes con CIDP<sup>181</sup>.

En los últimos años, la descripción de nuevas reactividades antigénicas contra moléculas de adhesión localizadas en el nodo/paranodo de Ranvier, ha puesto de manifiesto la relevancia de estas estructuras en la patogenia de la CIDP<sup>182</sup>. Estudios recientes utilizando microscopía electrónica en secciones transversales y longitudinales de nervio sural, ponen de manifiesto las diferencias anatomopatológicas existentes entre los pacientes con anticuerpos anti-CNTN1 y anti-NF155 y los pacientes con CIDP seronegativa<sup>183</sup>. Los pacientes con anticuerpos anti-CNTN1 y anti-NF155, aunque presentan una ligera reducción en la densidad de fibras mielinizadas junto con la presencia de ovoides de mielina, no presentan bulbos en cebolla, desmielinización mediada por macrófagos ni depósitos de complemento. De forma característica, en el paranodo de estos pacientes, existe una separación entre el axolema y los bucles de mielina de la célula de Schwann (Figura 8). La disrupción de la arquitectura paranodal y la pérdida de uniones en septo en el paranodo de los pacientes con anticuerpos anti-CNTN1 y anti-NF155, refuerzan la relevancia de estos autoanticuerpos en la inmunopatogenia de la enfermedad<sup>184,185</sup>.

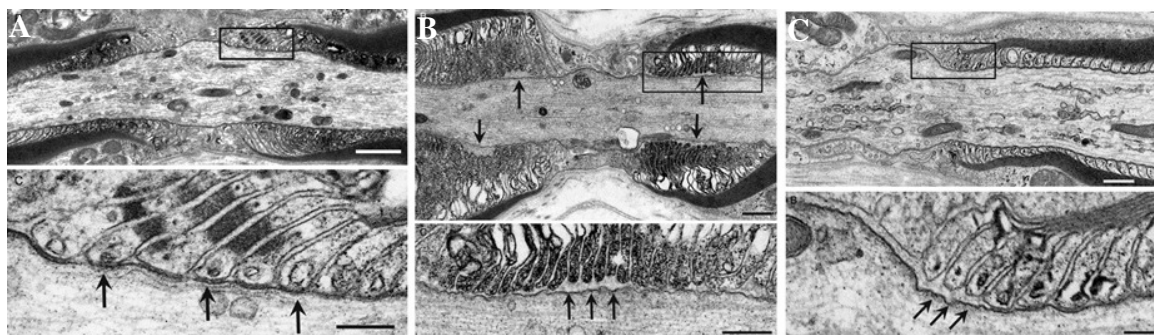


Figura 8. Microscopía electrónica en secciones longitudinales de nervio sural en pacientes con CIDP. CIDP seronegativa (A); CIDP NF155+ (B); CIDP CNTN1+ (C) Imágenes modificadas de Koike et al. 2017<sup>183</sup>.

En el único paciente de CIDP descrito con anticuerpos anti-CASPR1, la biopsia de nervio sural evidencia edema subperineural, pérdida axonal y ausencia de lesiones en bulbo de cebolla así como un leve aumento de las células T infiltradas. Asimismo, la morfología del NdR se encuentra alterada; con una elongación tanto del propio nodo como de la banda de canales de sodio del NdR. Como en los pacientes con anticuerpos anti-CNTN1 y anti-NF155, en el paranodo de este paciente con anticuerpos anti-CASPR1 también se observaron depósitos de IgG<sup>131</sup>.

1.2.3.1.2 INMUNIDAD CELULAR

La invasión del nervio periférico y la destrucción de mielina por parte de las células T y los macrófagos respaldan el papel de la inmunidad celular en el desarrollo de la CIDP. Clásicamente, los macrófagos se consideran las células efectoras finales en el proceso de destrucción de la vaina de mielina (desmielinización mediada por macrófagos)<sup>186</sup>, sin embargo múltiples evidencias apuntan a la contribución de las células T en la inmunopatogenia de la enfermedad (Figura 9). A destacar, la presencia de infiltrados inflamatorios en el nervio<sup>179</sup>; la expresión anómala de citoquinas y mediadores de la inflamación en suero y LCR de estos pacientes<sup>187,188</sup>; y la observación de subpoblaciones de células Treg reducidas o funcionalmente alteradas en la CIDP<sup>45</sup>.

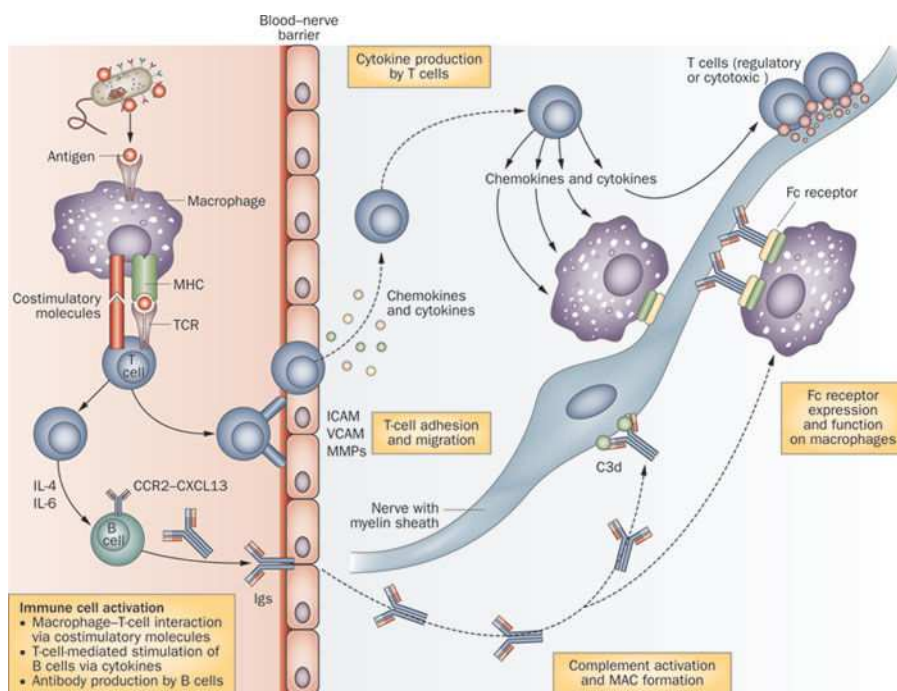


Figura 9. Esquema de la inmunopatogenia de la CIDP. Imagen extraída de Dalakas et al. 2011<sup>125</sup>.

Las biopsias de nervio sural de los pacientes con CIDP, además de predominantemente macrófagos<sup>189</sup>, contienen linfocitos T tanto CD4 como CD8 positivos cuyo TCR presenta restricción mono o oligoclonal<sup>190</sup>. Esta restricción coincide con la observada en sangre periférica, se reduce tras el tratamiento efectivo con IgIV y es mucho más notable en las células CD8+<sup>190,191</sup>. Estas observaciones apuntan a una reactividad antígeno-dependiente de las células T en el desarrollo de la CIDP, aunque hasta la fecha no se ha identificado ningún antígeno específico, exógeno o endógeno, responsable de esta respuesta<sup>47</sup>.



Estudios recientes han reportado diferencias en las subpoblaciones de células T circulantes observadas en pacientes con variantes típicas y atípicas de CIDP. Los pacientes con variantes atípicas presentan respuestas de tipo T más marcadas contra antígenos de la mielina que los pacientes con forma clásica, presentando frecuencias más elevadas de células T y de células CD4+, particularmente CD4+ de memoria<sup>192</sup>. Una vez más, estos hallazgos ponen de manifiesto la elevada heterogeneidad atribuible a la fisiopatología de la CIDP. En los pacientes de CIDP, tanto en el LCR como en sangre, también se ha observado un aumento del fenotipo Th17 de las células CD4 positivas, remarcando la posible relevancia de estas células en el desarrollo de la enfermedad<sup>193</sup>.

En el suero, el LCR y las células endoteliales de los pacientes con CIDP, se ha reportado un aumento de moléculas de adhesión solubles, quimiocinas, citocinas y MMP que contribuyen en el proceso de TEM de las células T<sup>188,194-197</sup>. La disrupción de la BHN es un fenómeno observable en los troncos y plexos nerviosos de los pacientes con CIDP<sup>198</sup>; éste es un proceso crítico en el desarrollo de la enfermedad ya que contribuye, entre otros, a facilitar el acceso al endoneuro de factores solubles como anticuerpos o factores del complemento<sup>180</sup>.

### 1.2.3.1.3 INMUNIDAD HUMORAL

---

La respuesta de los pacientes a la plasmaféresis y a terapias depletivas de células B, junto con la presencia de depósitos de complemento e inmunoglobulinas en el nervio de estos pacientes, evidencia un componente humoral en la inmunopatogenia de la CIDP<sup>125,181</sup>. La desmielinización y los bloqueos de la conducción observados en modelos animales tras la inyección intraneural de suero de pacientes con CIDP, contribuyen a confirmar dicho componente<sup>199</sup>. Sin embargo, los mecanismos que contribuyen a esta respuesta inmunológica son, hasta la fecha, desconocidos. Aunque en algunos casos se han reportado infecciones precedentes al debut de la CIDP, en ningún caso se ha identificado ni el agente etiológico ni el antígeno desencadenante de la respuesta autoinmune<sup>125</sup>. Adicionalmente, los mecanismos mediante los cuales los anticuerpos llegan al endoneuro apenas han sido estudiados<sup>50</sup>.

En la CIDP, se ha observado que la expresión del receptor FcγRIIb (CD32b), el único receptor FcγR expresado en las células B<sup>200</sup>, se ve reducida en las células B de estos



pacientes, aumentando tras el tratamiento con IgIV<sup>201</sup>. Dicho receptor ejerce una función inhibidora que impide que las células B con baja afinidad o con receptores autoreactivos entren al centro germinal y se conviertan en células plasmáticas<sup>202</sup>. De esta forma, el aumento de la expresión de FcγRIIB se relaciona con una producción disminuida de autoanticuerpos<sup>203</sup>. Se han descrito varios polimorfismos para este receptor asociados con múltiples enfermedades autoinmunes. En la CIDP, el polimorfismo 386C/-120A se ha descrito en varios pacientes, y se ha correlacionado con una disminución en la expresión de FcγRIIB<sup>201</sup>. En modelos animales de varias enfermedades autoinmunes, la disrupción de FcγRIIB por depleción o bloqueo de anticuerpos, revierte los efectos terapéuticos de la IgIV; sugiriendo un papel fundamental de este receptor en los mecanismos de acción de la IgIV<sup>204-207</sup>.

### 1.2.3.1.3.1 ANTICUERPOS CONTRA LA MIELINA Y LOS GANGLIÓSIDOS

Dada la naturaleza desmielinizante de la CIDP, la búsqueda de antígenos en esta patología se ha centrado durante muchos años en las proteínas de la mielina del nervio periférico. Aunque el papel neuritogénico de algunas de estas proteínas; como P0, P2 o PMP22; está descrito en modelos animales<sup>208-210</sup>, su rol como potenciales antígenos en la CIDP no está confirmado<sup>53</sup>. Se han detectado, de forma mayormente inespecífica, anticuerpos contra estas proteínas en pacientes con CIDP; detectándose también en controles y en pacientes con otras neuropatías inflamatorias y hereditarias<sup>211-214</sup>. Estudios más recientes no han replicado la detección de estos autoanticuerpos en pacientes con CIDP, sugiriendo una relevancia limitada de estos anticuerpos en la inmunopatogenia de la enfermedad<sup>53,215</sup>.

A diferencia del SGB, donde los anticuerpos anti-gangliósidos representan la característica patogénica más específica y permiten establecer asociaciones clínico-inmunológicas; la detección de anticuerpos anti-gangliósidos en la CIDP no ha permitido identificar patrones de reactividad específicos para esta enfermedad. Se han detectado anticuerpos contra los gangliósidos GM1, LM1, SGPG y contra sulfátidos, en grupos reducidos de pacientes de CIDP. Sin embargo, su relevancia clínica es desconocida<sup>216-219</sup>. Los anticuerpos anti-LM1 se han replicado en un subgrupo de pacientes de CIDP con ataxia y sin afectación craneal<sup>220</sup>. Estos resultados podrían reflejar un posible papel de los glucolípidos de membrana como antígenos candidatos en la CIDP.

### 1.2.3.1.3.2 ANTICUERPOS CONTRA ESTRUCTURAS DEL NODO DE RANVIER

Dada su relevancia para la conducción nerviosa, en los últimos cinco años, la búsqueda de nuevos antígenos en las regiones del nodo y paranodo de Ranvier ha ganado importancia<sup>182</sup>. El primer estudio que centró la atención sobre estas estructuras en las neuropatías inflamatorias, concretamente el SGB, evidenció anomalías en la morfología del NdR en las raíces ventrales y dorsales de estos pacientes cuyos NdR se encontraban elongados e infiltrados por macrófagos<sup>37</sup>. Estudios experimentales en modelos animales corroboraron la relevancia de los componentes del NdR en la inmunopatogenia de las neuropatías inflamatorias; en el modelo de EAN se observó que la presencia de anticuerpos contra NF186 y GMD precedía a una retracción del paranodo que se acompañaba de una deslocalización de canales de sodio y de potasio voltaje-dependientes<sup>221</sup>. Estudios posteriores confirmaron alteraciones en la arquitectura del nodo en pacientes con CIDP, observándose una expresión alterada de las proteínas CASPR1 y paranodina<sup>222</sup>. También se reportó una reactividad del suero de los pacientes contra múltiples estructuras del NdR (CNTN1, GMD, NF186) en preparaciones de nervio de origen murino<sup>182</sup>. Aunque dicho estudio no permitiera una correlación entre la clínica y reactividad inmunológica de estos pacientes, éste contribuyó en la noción de que una reactividad heterogénea contra estructuras del nodo podría contribuir en la fisiopatología de la CIDP.

Los anticuerpos contra las moléculas de adhesión paranodales CNTN1 y NF155 fueron los primeros autoanticuerpos que se reportaron asociados a variantes clínicas muy concretas en grupos reducidos de pacientes de CIDP<sup>129,130</sup>. Estos autoanticuerpos de la subclase IgG4, no fijan complemento ni se unen a receptores de inmunoglobulinas y su presencia se asocia a una pobre respuesta a IgIV y a una excelente respuesta a rituximab<sup>137</sup>. Ambos autoanticuerpos han sido descritos en varias series de pacientes<sup>223-225</sup> y su capacidad patogénica ha sido demostrada en modelos animales<sup>54,55</sup>, confirmando el rol determinante de éstos en la fisiopatología de la CIDP. Estudios recientes han asociado con mayor frecuencia del alelo HLA de clase II DRB1\*15 en los pacientes NF155 positivos en comparación a los pacientes con CIDP seronegativa y a la población general. Estos resultados sugieren un factor de riesgo genético en la CIDP y ponen de manifiesto que la variante con anticuerpos anti-NF155 constituye una entidad clínica diferenciada por sus rasgos clínicos, electrofisiológicos, fisiopatológicos y genéticos<sup>226</sup>.

Más recientemente, otros autoanticuerpos dirigidos contra moléculas de adhesión del Ndr se han descrito en grupos reducidos de pacientes. Sin embargo, su correlación clínico-inmunológica aún debe ser dilucidada. Se han descrito anticuerpos contra CASPR1 en dos pacientes con neuropatías inflamatorias, uno con SGB y otro con CIDP, ambos con dolor neuropático<sup>131</sup>. En el único caso de CIDP, los anticuerpos fueron de la subclase IgG4, no fijaban complemento, y se asociaron a una pobre respuesta a IgIV y una excelente respuesta a rituximab. A grandes rasgos, los anticuerpos contra las formas nodales de la neurofascina, anti-NF140/NF186, son predominantemente IgG4 y no fijan complemento<sup>132</sup>. Sin embargo, estos pacientes responden a IgIV y corticoesteroides. La negativización de los autoanticuerpos en dos de los pacientes se correlacionó con la remisión clínica, sugiriendo un papel relevante de éstos en el desarrollo de la neuropatía.

---

### 1.2.3.2 INMUNOPATOGENIA DE LAS NEUROPATÍAS PARANEOPLÁSICAS

#### 1.2.3.2.1 HISTOPATOLOGÍA

En los pacientes con SNPs que afectan al SNP, la biopsia de nervio sural no está generalmente indicada, ya que ésta sólo muestra cambios inespecíficos; y dichos trastornos suelen presentar características clínicas o autoanticuerpos que contribuyen a su diagnóstico<sup>2</sup>. Aun así, existen estudios histopatológicos, mayoritariamente en la SSN, que sugieren un mecanismo inmunomediado en estas enfermedades<sup>165</sup>. Éstos destacan la infiltración de células inflamatorias en los GRD, el endoneuro periférico y los vasos epineurales, así como la pérdida de neuronas sensitivas de mayor diámetro en los GRD y el nervio sural de estos pacientes<sup>227-229</sup>. Más recientemente, se ha demostrado la pérdida de fibras pequeñas mielinizadas y no mielinizadas en el nervio sural de los pacientes con SSN y dolor neuropático<sup>230</sup>.

#### 1.2.3.2.2 INMUNIDAD CELULAR

Si bien la detección de autoanticuerpos en los SNPs sugiere un papel fundamental de la inmunidad humoral en su inmunopatogenia, la inmunidad celular también parece tener un papel relevante en la etiología de estas enfermedades<sup>160</sup>. Particularmente, en aquellos trastornos con antígenos intracelulares, en los que es difícil atribuir un componente patogénico a los autoanticuerpos<sup>69</sup>.

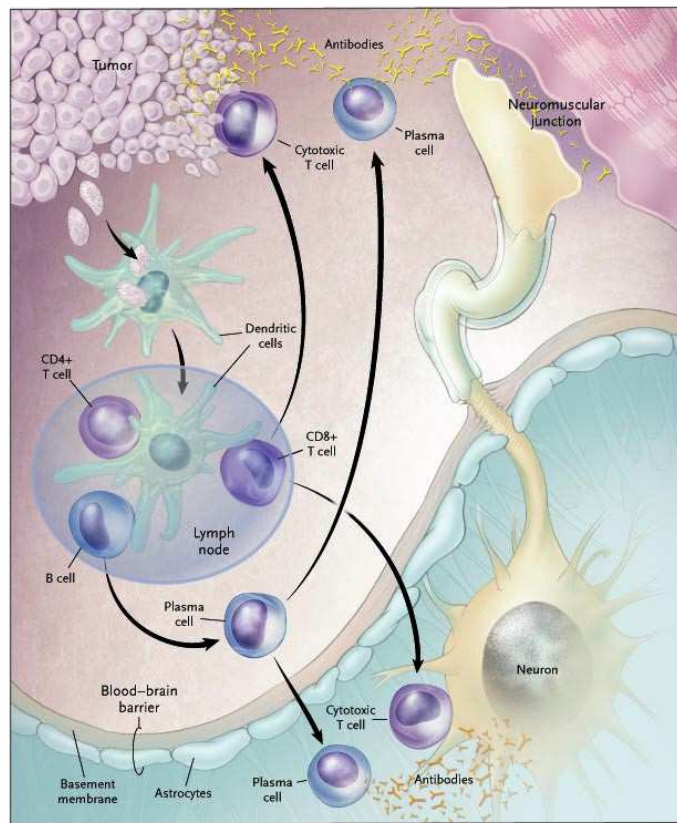


Figura 10. Esquema de la inmunopatogenia de los Síndromes Neurológicos Paraneoplásicos. Imagen extraída de Darnell et al. 2003<sup>56</sup>.

Múltiples hallazgos, sobretudo en SNPs del SNC, sugieren esta participación de la inmunidad celular. En primer lugar, los tumores de pacientes con SNPs, aunque idénticos en su tipo histológico a los tumores de pacientes sin SNPs, se encuentran generalmente más infiltrados de células inflamatorias, incluidas células T, células B y células plasmáticas<sup>56</sup>. La presencia de infiltrados inflamatorios el sistema nervioso de estos pacientes también está ampliamente descrita, y está particularmente estudiada en el síndrome anti-Hu, donde infiltrados mayoritariamente formados por células T, se encuentran en contacto con las neuronas sensitivas de los GRD, en la médula espinal y el cerebro. Ocasionalmente, también se pueden encontrar en las raíces posteriores y los nervios periféricos<sup>166</sup>. A pesar de la presencia de células CD4+, las principales células T en contacto directo con las neuronas son células citotóxicas CD8 que expresan TIA-1, una proteína citolítica que se encuentra en los gránulos de estas células y que podría ser, junto con la perforina, responsable del daño neuronal<sup>166,231</sup>. La expresión de moléculas MHC de tipo I descrita en neuronas podría contribuir en la noción de un daño neuronal mediado por células CD8+ en estas enfermedades<sup>232</sup>. Adicionalmente, el aumento de la expresión de la

molécula de adhesión ICAM1 en las áreas afectadas de estos pacientes, podría sugerir un aumento de la permeabilidad de la BHE y la BHN<sup>231</sup>, un fenómeno comúnmente descrito en otras enfermedades del SNC y en las neuropatías inflamatorias.

Igual que en la CIDP, se ha reportado que las células T de los pacientes con SNPs asociados a anticuerpos anti-Hu y anti-Yo presentan un TCR con repertorio limitado, con mono u oligoclonalidad hacia antígenos específicos<sup>232-234</sup>. Estas observaciones apuntan a una reactividad antígeno-dependiente de las células T en el desarrollo de estos trastornos, aunque hasta la fecha no se ha descrito el mecanismo implicado en la inmunopatogenia de los SNPs<sup>56</sup>. La figura 10 resume los principales mecanismos sospechados en estas patologías.

### 1.2.3.2.3 INMUNIDAD HUMORAL

---

Desde la descripción de los anticuerpos anti-Hu en 1985<sup>235</sup>, y la posterior identificación de otros anticuerpos antineuronales altamente específicos en el suero de los pacientes con SNPs, a estos trastornos se les atribuye un origen autoinmune<sup>236-242</sup>. Tal y como se ha comentado previamente, los anticuerpos paraneoplásicos se pueden dividir en anticuerpos bien caracterizados o parcialmente caracterizados<sup>66</sup>.

Se consideran bien caracterizados aquellos anticuerpos, cuyo antígeno es conocido, que se han asociado repetidamente a determinados síndromes neurológicos y tumores en cohortes extensivas de pacientes; y que han sido corroborados, incluso en ausencia de un tumor detectable, por diferentes laboratorios usando técnicas validadas<sup>66</sup>. Los anticuerpos bien caracterizados incluyen; los anticuerpos onconeuronales contra antígenos intracelulares anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, anti-CV2/CRMP5, anti-Ta/Ma2, anti-anfifisina y más recientemente los anticuerpos anti-Tr, anti-SOX1, anti-recoverina y anti-GAD<sup>66,151</sup> (Tabla 4).

En los SNPs, los autoanticuerpos también se pueden clasificar en función de la localización de su antígeno. De esta manera se han descrito dos tipos de anticuerpos en estos trastornos: los anticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares; definidos como anticuerpos onconeuronales; y los anticuerpos dirigidos a antígenos de la membrana celular<sup>69,243</sup>.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Tumores asociados</b>	<b>Síndromes neurológicos</b>
<b>Anti-Hu (ANNA1)</b>	CPCP	Encefalomielitis, encefalitis límbica, degeneración cerebelosa, <b>SSN</b> , pseudoobstrucción gastrointestinal
<b>Anti-Yo (PCA1)</b>	Ovario, mama	Degeneración cerebelosa
<b>Anti-CV2 (CRMP5)</b>	CPCP, timoma	Encefalomielitis, encefalitis límbica, degeneración cerebelosa, <b>SSN</b> , <b>neuropatía sensitivomotora</b> , pseudoobstrucción gastrointestinal
<b>Anti-Ri (ANNA2)</b>	Mama, CPCP	Encefalitis del tronco
<b>Anti-Ma2 (Ta)</b>	Testicular, pulmón no CPCP	Encefalitis límbica, encefalitis del tronco, degeneración cerebelosa
<b>Anti-anfifisina</b>	Mama, CPCP	Síndrome de la persona rígida
<b>Anti-Tr (PCA-Tr)</b>	Linfoma Hodgkin	Degeneración cerebelosa
<b>Anti-SOX1</b>	CPCP	Degeneración cerebelosa; LEMS
<b>Anti-recoverina</b>	CPCP	Retinopatía asociada a cáncer
<b>Anti-GAD</b>	CPCP, pulmón no CPCP, timoma, páncreas	Síndrome de la persona rígida, ataxia cerebelosa, encefalomielitis, encefalitis límbica, degeneración cerebelosa

Tabla 4. Anticuerpos onconeuronales bien caracterizados. Tabla modificada de Graus et al. 2004<sup>66</sup>.

Los anticuerpos contra antígenos intracelulares incluyen los diez anticuerpos onconeuronales bien caracterizados, la mayoría de los cuales se asocian a síndromes que afectan al SNC. De entre estos anticuerpos, los anticuerpos anti-Hu y anti-CV2/CRMP5 son los que se asocian más frecuentemente a neuropatías paraneoplásicas<sup>157</sup>. Sin embargo, también se han descrito casos aislados de neuropatías asociadas a anti-Yo, anti-Ma2 y anti-anfifisina<sup>244-246</sup>. En los pacientes con anticuerpos anti-Hu, la neuropatía periférica es la manifestación más frecuente, pudiendo afectar hasta un 60-80% de los casos<sup>157</sup>. Los anticuerpos anti-Hu se asocian principalmente a CPCP y a SSN. Sin embargo, algunos de éstos pacientes pueden ser seronegativos o presentar otros autoanticuerpos (anti-anfifisina o anti-CV2/CRMP5) de forma adicional o alternativa a los anti-Hu<sup>247</sup>. En los pacientes con anticuerpos anti-CV2/CRMP5, la neuropatía llega a afectar hasta el 57% de los pacientes, frecuentemente de forma concomitante a otras afectaciones del SNC o al síndrome de

Eaton-Lambert. Dicha neuropatía puede ser sensitiva o sensitivomotora, y frecuentemente se asocia a CPCP o a timoma<sup>162,167</sup>. Los anticuerpos intracelulares son valiosos biomarcadores de diagnóstico de un cáncer subyacente y guían la detección de tumores hacia ciertos órganos<sup>66,248</sup>. Sin embargo varias observaciones sugieren que estos anticuerpos no participan en la patogénesis de los SNPs. La localización inaccesible de sus antígenos, en el núcleo o el citoplasma, dificulta la explicación del rol patogénico de estos autoanticuerpos. Adicionalmente los intentos fallidos de producir modelos animales tanto por inmunización pasiva como por inmunización activa en estas enfermedades sugieren que los autoanticuerpos intracelulares no juegan un papel relevante en la patogenia de dichos síndromes<sup>249-251</sup>. Las hipótesis actuales proponen un papel de las células T citotóxicas en el desarrollo de estos síndromes neurológicos<sup>65,69</sup>.

En los SNPs, los anticuerpos dirigidos a antígenos de la membrana celular neuronal o a receptores sinápticos se han relacionado con varios síndromes neurológicos y, aunque probablemente sean patogénicos, su detección no implica necesariamente un origen paraneoplásico de la enfermedad<sup>252,253</sup>. Los pacientes con algunos de estos anticuerpos tienden a responder favorablemente a la inmunoterapia y presentan una correlación entre la clínica y los títulos de autoanticuerpos, sugiriendo una estrecha relación de éstos con la patogénesis de los SNPs<sup>252</sup>.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Tumores asociados</b>	<b>Síndromes neurológicos</b>
<b>Anti-NMDAR</b>	Ovario	Encefalitis
<b>Anti-GABA<sub>B</sub>R</b>	CPCP	Encefalitis límbica
<b>Anti-CASPR2</b>	Timoma	Síndrome de Morvan, neuromiotonía, encefalitis límbica
<b>Anti-AMPAR</b>	CPCP, mama, timoma	Encefalitis límbica
<b>Anti-VGCC</b>	CPCP	Degeneración cerebelosa, síndrome Eaton-Lambert
<b>Anti-mGluR5</b>	Linfoma Hodgkin	Encefalitis límbica
<b>Anti-mGluR1</b>	Linfoma Hodgkin, próstata	Degeneración cerebelosa

Tabla 5. Anticuerpos contra antígenos sinápticos o de membrana asociados a SNPs. Tabla modificada de Graus et al. 2012<sup>152</sup>.



Los anticuerpos contra antígenos de membrana se asocian a múltiples síndromes del SNC así como a síndromes del SNP<sup>152,153</sup> (Tabla 5). En el SNP, se han descrito anticuerpos contra los canales de calcio (anti-VGCC) asociados con el Síndrome de Eaton-Lambert<sup>254</sup> y contra el antígeno de membrana CASPR2; situado en la región yuxtaparanodal del Ndr; asociados a neuromiotonía de origen paraneoplásico<sup>247</sup>. Los anticuerpos anti-CASPR2 también se asocian encefalitis límbica y síndrome de Morvan en pacientes con o sin timoma<sup>255</sup>. Más recientemente anticuerpos contra los receptores de Netrin-1 (DCC y UNC5A) también se han reportado en asociación a timoma en pacientes con neuromiotonía y miastenia gravis<sup>256</sup>. Si bien se desconoce la patogenia de ambos autoanticuerpos, estos hallazgos sugieren un posible papel de los antígenos de membrana en el desarrollo de SNPs en el nervio periférico.





## 2. HIPÓTESIS



### HIPÓTESIS

#### 2.1 HIPÓTESIS GENERAL

- Las neuropatías autoinmunes son un grupo heterogéneo de trastornos neurológicos de fisiopatogenia desconocida a los cuales se les atribuye un componente humoral. La identificación de los antígenos contra los cuales reaccionan estos pacientes puede llegar a tener utilidad clínica.
- Los autoanticuerpos pueden representar biomarcadores útiles para el diagnóstico, el pronóstico y el manejo terapéutico de estos pacientes.
- El uso de técnicas de cribado sistemático sobre células neurales de origen periférico puede contribuir a la identificación de dichos autoanticuerpos.

#### 2.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

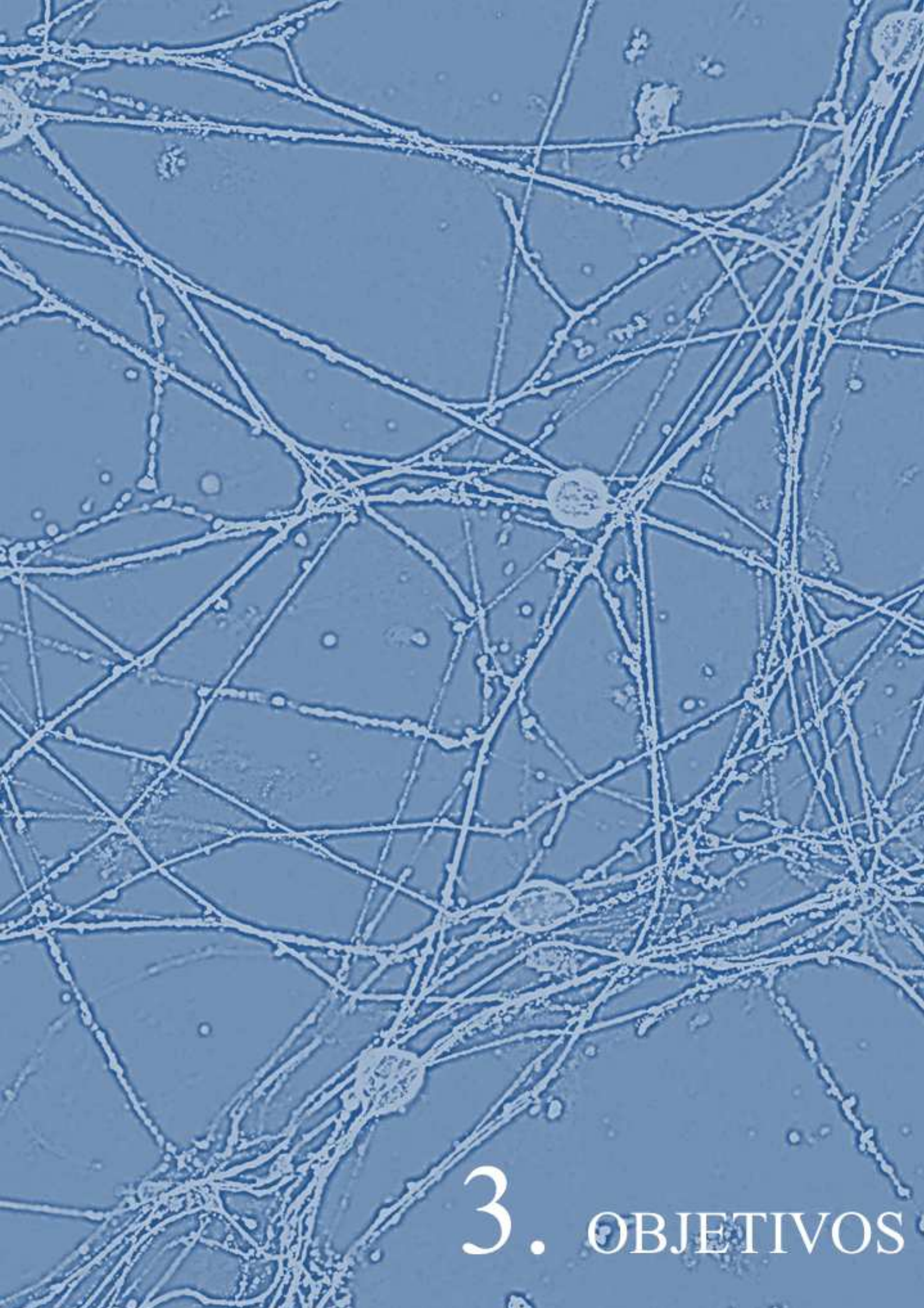
##### 2.2.1 REACTIVIDADES ANTIGÉNICAS EN CIDP

- La CIDP es un síndrome que comprende diversas variantes de enfermedad caracterizadas por reactividades antigénicas diversas.
- Los antígenos diana de la mayor parte de pacientes con CIDP no han sido identificados aún.
- La aplicación de técnicas de cribado sistemático permitirá identificar nuevos antígenos o estructuras neurales diana responsables de la respuesta inmunológica en la CIDP.
- La identificación de nuevos antígenos diana contribuirá a identificar subgrupos homogéneos de pacientes con CIDP con características definidas.

### 2.2.2 REACTIVIDADES ANTIGÉNICAS EN NEUROPATÍAS PARANEOPLÁSICAS

- Las neuropatías paraneoplásicas constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades.
- Los antígenos diana de la mayor parte de pacientes con síndromes paraneoplásicos periféricos no clásicos no han sido identificados todavía.
- La aplicación de técnicas de cribado sistemático ayudará a identificar nuevos antígenos o estructuras neurales diana en síndromes paraneoplásicos periféricos.
- La identificación de los antígenos diana contribuirá en la identificación precoz de neuropatías paraneoplásicas y su asociación a neoplasias específicas.





### 3. OBJETIVOS





### OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar potenciales nuevos autoanticuerpos en la CIDP y en las neuropatías paraneoplásicas.

#### 3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

##### 3.2.1 REACTIVIDADES ANTIGÉNICAS EN CIDP

1. Testar la reactividad de los pacientes de CIDP contra antígenos previamente descritos para esta enfermedad: proteínas de la mielina, gangliósidos y contra moléculas localizadas en el nodo de Ranvier.
2. Realizar un cribado de nuevas reactividades antigénicas contra los principales componentes del nervio periférico (neuronas de DRG, neuronas motoras y células de Schwann). Identificar los potenciales antígenos y establecer correlaciones clínico-inmunológicas.

##### 3.2.2 REACTIVIDADES ANTIGÉNICAS EN NEUROPATÍAS PARANEOPLÁSICAS

1. Testar la reactividad contra moléculas del nodo de Ranvier y contra otras moléculas de adhesión celular neurales asociadas a la patogénesis de tumores de los pacientes con neuropatías paraneoplásicas sin evidencia de anticuerpos onconeuronales.
2. Realizar un cribado de nuevas reactividades antigénicas contra los principales componentes del nervio periférico (neuronas de DRG, neuronas motoras y células de Schwann) en pacientes con neuropatías paraneoplásicas. Identificar los potenciales antígenos y establecer correlaciones clínico-inmunológicas.





## 4. RESULTADOS





## RESULTADOS

## 4.1 ARTÍCULO I

Scientific Reports. Factor de impacto: 4,259. Primer cuartil.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Antibodies against peripheral nerve antigens in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy

Luis Querol<sup>1,2</sup>, Ana M Siles<sup>1,2</sup>, Roser Alba-Rovira<sup>1,2</sup>, Agustín Jáuregui<sup>3</sup>, Jérôme Devaux<sup>4</sup>, Catherine Faivre-Sarrailh<sup>4</sup>, Josefa Araque<sup>1,2</sup>, Ricard Rojas-García<sup>1,2</sup>, Jordi Díaz-Manera<sup>1,2</sup>, Elena Cortés-Vicente<sup>1,2</sup>, Gisela Nogales-Gadea<sup>5</sup>, Miquel Navas-Madroñal<sup>1,2</sup>, Eduard Gallardo<sup>1,2</sup> & Isabel Illa<sup>1,2</sup>

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is a heterogeneous disease in which diverse autoantibodies have been described but systematic screening has never been performed. Detection of CIDP-specific antibodies may be clinically useful. We developed a screening protocol to uncover novel reactivities in CIDP. Sixty-five CIDP patients and 28 controls were included in our study. Three patients (4.6%) had antibodies against neurofascin 155, four (6.2%) against contactin-1 and one (1.5%) against the contactin-1/contactin-associated protein-1 complex. Eleven (18.6%) patients showed anti-ganglioside antibodies, and one (1.6%) antibodies against peripheral myelin protein 2. No antibodies against myelin protein zero, contactin-2/contactin-associated protein-2 complex, neuronal cell adhesion molecule, gliomedin or the voltage-gated sodium channel were detected. In IgG experiments, three patients (5.3%) showed a weak reactivity against motor neurons; 14 (24.6%) reacted against DRG neurons, four of them strongly (7.0%), and seven (12.3%) reacted against Schwann cells, three of them strongly (5.3%). In IgM experiments, six patients (10.7%) reacted against DRG neurons, while three (5.4%) reacted against Schwann cells. However, results were not statistically significant when compared to controls. Immunoprecipitation experiments identified CD9 and L1CAM as potential antigens, but reactivity could not be confirmed with cell-based assays. In summary, we describe a diverse autoantibody repertoire in CIDP patients, reinforcing the hypothesis of CIDP's pathophysiological heterogeneity.

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is a disabling disease with a pathogenesis that remains largely unknown<sup>1</sup>. CIDP response to immune therapies and scarce experimental evidence on passive transfer animal models suggest that humoral factors play a role in its pathogenesis<sup>2</sup>. CIDP diagnosis is based on clinical and electrophysiological criteria<sup>3</sup> that allow the inclusion of a broad spectrum of patients within CIDP, including typical and atypical variants. This heterogeneity has hindered the description of disease-specific biomarkers, despite intensive research efforts<sup>4</sup>.

The response of CIDP patients to intravenous immunoglobulin (IVIg) and plasma exchange (PIEx) suggests that humoral factors are involved in its pathogenesis. The search of autoantibodies has been the most important laboratory research topic in CIDP. Initial focus was placed on myelin antigens. Classical studies, using diverse techniques, detected higher frequencies of antibodies against myelin protein zero (MPZ), peripheral myelin protein 2 (PMP2) or peripheral myelin protein 22 (PMP22)<sup>5-10</sup>. However, meaningful clinical-immunological correlations with those antigens were not established. CIDP patients harboring antibodies against LM1-containing

<sup>1</sup>Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras, CIBERER, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Fundación Favaloro, Buenos, Aires, Argentina. <sup>4</sup>Aix-Marseille Université, CNRS, CRN2M-UMR7286, Marseille, France. <sup>5</sup>Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. Luis Querol and Ana M Siles contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.Q. (email: lquerol@santpau.cat)

Received: 4 September 2017  
Accepted: 17 October 2017  
Published online: 31 October 2017

Patient ID	Results
7	sulfatides IgM 1/31356
	sulfatides IgG 1/832
22	IgM aGM1 1/500
24	sulfatides IgM 1/592
31	IgG GM1 1/6160
	IgM GM1 1/2314
	IgM aGM1 1/1442
	IgM GD1b1/500
32	IgG aGM1 1/580
36	IgM GM1 1/2154
39	IgG aGM1 1/528
	IgG GD1a 1/528
	IgM aGM1 1/2559
	sulfatides IgM 1/3245
55	sulfatides IgM 1/800
	IgM aGM1 1/500
56	IgG aGM1 1/1000
	IgM GM1 1/500
64	IgM GM1 > 1/12500
	IgM aGM1 > 1/12500
	IgM GD1b > 1/12500
65	IgM GM1 1/7829
	IgM aGM1 1/2359
	IgM GD1b 1/2868

**Table 1.** CIDP patients harbouring anti-ganglioside antibodies. Fifty-nine patients were screened using our institution's anti-ganglioside ELISA diagnostic technique, further confirmed by TLC.

ganglioside complexes, present more frequently with ataxia, although these results await replication in independent cohorts<sup>11,12</sup>. We and others have recently detected antibodies targeting node of Ranvier proteins such as gliomedin, neuronal cell adhesion molecule (NrcAM), neurofascin 140 (NF140), neurofascin 186 (NF186); and paranode of Ranvier; contactin-1 (CNTN1), contactin-associated protein 1 (CASPR1) and neurofascin 155 (NF155)<sup>13-17</sup>. Our group described that patients harboring antibodies against CNTN1 and NF155 of the immunoglobulin G4 (IgG4) isotype present with specific clinical features<sup>15,18</sup>. Studies by other groups have validated these clinical-immunological correlations and refined the clinical phenotypes and paraclinical features associated to these autoantibodies<sup>19-23</sup>. *In vitro* and *in vivo* models of anti-CNTN1 IgG4 passive-transfer, demonstrate that anti-CNTN1 antibodies are pathogenic, strengthening the idea that CIDP is an autoantibody-mediated disease<sup>24</sup>.

Considering that CIDP-specific autoantibodies are not detected in the majority of CIDP patients we developed this study to: (1) systematically screen for immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) autoantibodies against previously described antigens and peripheral nerve components, (2) identify the molecular targets of the immune response in those patients reacting against peripheral nerve components in which the target antigens were unknown and (3) to establish clinical-immunological correlations.

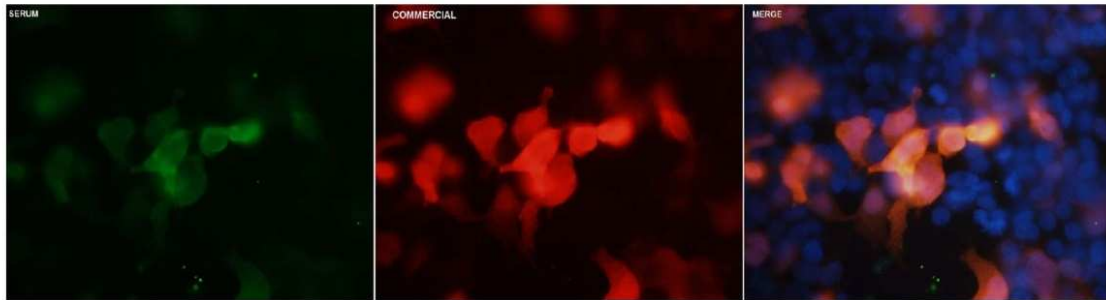
## Results

Sixty-five patients fulfilling criteria for CIDP were identified and included in the study. Twenty-nine of them (29/65; 44.6%) were women (mean age  $64.0 \pm 17.3$  years) while 36 of them (36/65; 55.4%) were men (mean age  $61.3 \pm 15.3$  years). Forty-four patients (67.7%) presented with a typical CIDP while 21 presented with an atypical CIDP (32.3%) (Supplementary Table S1).

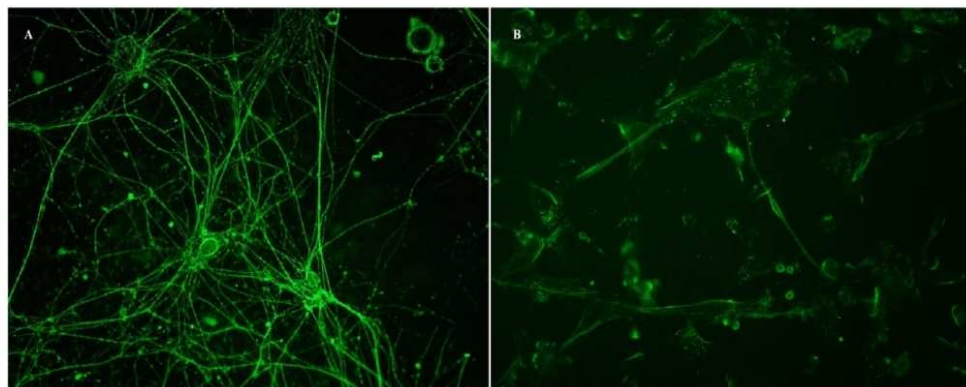
Eleven patients (11/59; 18.6%) showed anti-ganglioside antibody reactivity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Four of them (6.7%) showed high anti-GM1 IgM antibody titers (two of them with anti-GD1b IgM, with or without additional reactivities) (Table 1). Four patients reacted against CNTN1 (4/65; 6.2%), one against the CNTN1/CASPR1 complex (1/65; 1.5%) and three against NF155 (3/65; 4.6%). All of them except two (one CNTN1 and one NF155 positive) were previously described elsewhere<sup>15,18</sup>. Only one patient (1/62; 1.6%) reacted against PMP2 (Fig. 1). CSF from this patient also showed IgG reactivity against PMP2-transfected human embryonic kidney (HEK) cells. None of our CIDP patients reacted against any of the other candidate antigens (MPZ, NrcAM, contactin-2 (CNTN2)/contactin-associated protein 2 (CASPR2) complex, gliomedin and voltage-gated sodium channel subunits B1 (NavB1) and B2 (NavB2)). For further detailed results see Supplementary Table S2.

Immunocytochemistry (ICC) experiments with dorsal root ganglion (DRG) and motor neurons and Schwann cells (human undifferentiated Schwann cell line) were used to identify novel reactivities against neural components. Patients with anti-CNTN1, anti-CNTN1/CASPR1, who show strong reactivity against any type of neuron,





**Figure 1.** Positive PMP2 ICC. HEK293 cells were transfected with a mammalian expression vector encoding PMP2 with the use of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) and ICC was performed as described in Supplementary Table S3. Patient's 22 sera positivity can be appreciated in green, commercial antibody staining in red and a merged picture of both can be found above with nuclei stained in blue.



**Figure 2.** IgG positivity in DRG neurons and Schwann cells. Patients' sera were tested by IgG and IgM ICC experiments with live DRG neurons and Schwann cells. Strong staining with the use of an anti-human IgG Alexa Fluor 488 antibody (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) can be appreciated for DRG neurons (A) and Schwann cells (B).

and anti-NF155 antibodies, who do not react against neurons, were excluded from these analyses. As a result, a maximum of 57 patients were screened for novel reactivities. During the course of our experiments we ran out of sera from one of the patients, leaving a total of 56 patients in IgM experiments.

In IgG experiments, three patients (3/57; 5.3%) showed only mild IgG staining in motor neuron ICC and therefore were not further used for immunoprecipitation (IP) experiments. Fourteen patients (14/57; 24.6%) presented with IgG reactivity against DRG neurons. Of those, only four (4/57; 7.0%) showed moderate to intense reactivity against DRG (Fig. 2A). Sera from three of these patients showing moderate or strong reactivity and a normal control were used to try to identify the target antigens using DRG neurons as the IP substrate. No relevant antigens were identified in comparison to the control serum. Finally, we used a commercial human undifferentiated Schwann cell line to screen for antibodies against Schwann cells. Seven patients (7/57; 12.3%) showed IgG reactivity towards the human Schwann cell line, although only three (3/57; 5.3%) showed consistent moderate to high intensity staining (Fig. 2B). Interestingly, the only patient showing antibodies against PMP2 showed weak reactivity against human Schwann cells. Sera from these three patients strongly reacting against human Schwann cells and one control serum were used for IP experiments, but mass spectrometry analysis did not reveal any relevant antigen in CIDP patients when compared to the control individual. Two patients with weak reactivity against Schwann cells also showed weak staining in DRG neurons ICC. Another patient, highly reactive against Schwann cells also showed weak reactivity against DRG neurons. No cross-reactivity was found between motor neurons and DRG neurons or Schwann cells (see Table 2). Additionally, statistical comparison between ICC results from patients and controls did not provide evidence of differentially relevant IgG staining in DRG neurons ( $p = 0.6793$ ) or Schwann cells ( $p = 0.5476$ ) (Table 3).

In IgM experiments, six patients (6/56; 10.7%) showed reactivity against DRG neurons, while three (3/56; 5.4%) reacted against a human Schwann cell line. Only one patient (1/56; 1.8%) per each group presented with moderate (score two out of three) intensity IgM staining (Table 2). As with IgG experiments, no cross-reactivity was either appreciated between both cell types. IgM IP analysis were not performed in this study, due to the staining being exclusively moderate and poorly significant, as only one in 56 (1.8%) patients featured it in both cell types. As with IgG experiments, statistical comparison between IgM ICC results from patients and controls showed no statistically significant differences between both groups in DRG neurons ( $p = 0.2565$ ) or Schwann cells ( $p = 1$ ) (Table 3).

## RESULTADOS

Patient ID	Motor neurons IgG	Schwann cells IgG	Schwann cells IgM	Drg neurons IgG	Drg neurons IgM	PMP2/ICC
12	0	0	0	2	0	0
18	0	0	0	1	2	ND
22	0	0	0	0	0	3
23	0	3	1	1	0	0
33	0	0	ND	3	ND	0
48	0	0	0	2	0	0
50	0	3	1	0	0	0
56	0	2	0	0	0	0
58	0	0	2	0	0	0
64	0	1	0	2	0	0

**Table 2.** CIDP patients with moderate to strong reactivity in ICC experiments.

	Controls	Patients	P value
Schwann cells IgG ICC	0/28 (0%)	3/57 (5.3%)	0.5476
Schwann cells IgM ICC	0/28 (0%)	1/56 (1.8%)	1
DRG neurons IgG ICC	3/28 (10.7%)	4/57 (7.0%)	0.6793
DRG neurons IgM ICC	2/28 (7.1%)	1/56 (1.8%)	0.2565

**Table 3.** Statistical analysis of DRG neurons and Schwann cells ICC in CIDP patients and healthy controls. Moderate to strong fluorescence intensity scores, including scores two and three, and other stainings, featuring scores zero and one, from DRG neurons and Schwann cells IgG and IgM ICC experiments from patients and controls were analyzed using contingency analysis with the application of a two-tailed Fisher's exact test, accepting an alpha-level <0.05 to determine significance.

Whole nerve lysate from rat sciatic nerve and human cauda equina served as substrate for IP experiments with pooled sera from five typical CIDP cases. L1 cell adhesion molecule (L1CAM), a protein of the neurofascin family, was identified as a potential candidate antigen in the whole-nerve sciatic nerve lysate IP experiment but confirmatory ICC tests with L1CAM-transfected HEK cells did not confirm reactivity in any of the typical CIDP cases. Cluster of differentiation 9 (CD9), a protein of the tetraspanin family present in the paranode of Ranvier, was identified as a potential candidate antigen using human cauda equina as the substrate for IP studies with typical CIDP cases but, again, this was not confirmed in ICC experiments using CD9-transfected HEK cells.

No specific clinical features were associated with reactivity against each neural cell. The two patients with IgM antibodies against GM1 plus GD1b presented with an asymmetric sensory-motor onset in the upper limbs compatible with Lewis-Sumner CIDP variant, although later in the disease course progressed towards a bilateral, symmetric polyneuropathy. The other two patients with anti-GM1 antibodies presented with a typical CIDP variant. Interestingly, three of the anti-GM1 positive patients showed normal sensory nerve conduction despite severe sensory involvement, suggesting preganglionic damage. The fourth patient showed sensory-motor involvement in the EMG. Finally, the only patient reacting against PMP2 presented with a typical CIDP phenotype.

## Discussion

Our study describes a comprehensive autoantibody screening approach to identify clinically relevant antigens in CIDP, and provides experimental evidence of the immunopathological diversity in patients fulfilling CIDP diagnostic criteria. A subset of seronegative CIDP patients reacted against neural structures and gangliosides. However, IP experiments in patients reacting against neural cells did not reveal novel antigens, and frequencies of reactivity against neural cells did not differ from normal controls. We did not identify patients harboring antibodies against node/paranode of Ranvier proteins other than CNTN1 or NF155.

Aside from the inclusion of a few new CIDP patients in comparison to previous studies<sup>15,18</sup>, the novelty of our work relies on describing one new CNTN1 positive patient, one new NF155 positive patient, one patient positive for PMP2 and 11 CIDP patients with anti-ganglioside antibodies. Additionally, we have tested candidate antigens described in the bibliography and performed systematic antigen screening in rat dorsal root ganglion neurons, rat motor neurons and a human undifferentiated Schwann cell line. Systematic screening of serum reactivity against the two neuronal components of peripheral nerves, DRG and motor neurons, has never been performed before. In fact, our previous studies used hippocampal neurons, rat teased nerve fibers and rat brain sections to screen reactivity<sup>15,18</sup>. Therefore, although a partial sample overlap must be acknowledged, the different substrates used in our methods grant novelty and relevance to our results.

The search for diagnostic biomarkers in CIDP has been a research topic for decades<sup>2</sup>. Most patients with CIDP show an excellent response to PLEX and IVIg<sup>25,26</sup>. Response to IVIg follows time dynamics that strongly suggest direct competition of the therapeutic immunoglobulins with pathogenic autoantibodies<sup>27</sup>. The presence of IgG, IgM and complement deposits has been described in chronic inflammatory neuropathies for almost 40 years<sup>28</sup> and confirmatory studies that passive transfer of IgG from CIDP patients led to demyelinating nerve pathology were performed



17 years ago<sup>29</sup>. However, the target antigens for most CIDP patients remain elusive. Considering the demyelinating nature of CIDP, the neurotogenic potential of myelin proteins and their discovery in some demyelinating hereditary neuropathies, myelin proteins were extensively studied as potential antigens in CIDP. MPZ, PMP2, PMP22 and connexin-31 among others were tested as possible candidate antigens, but clinically relevant autoantibodies could not be established<sup>15,7,10,30-32</sup>. We tried to replicate the results with two of those antigens (MPZ and PMP2) and found only one patient with antibodies against PMP2, both in serum and CSF, precluding further clinical correlations.

Gangliosides and ganglioside complexes are well-established targets of humoral responses and provide useful clinical-immunological correlations in diverse inflammatory neuropathies<sup>33</sup>. Considering this, anti-ganglioside antibodies have also been studied in CIDP and other chronic inflammatory neuropathies<sup>34,35</sup>. Diverse CIDP-associated anti-ganglioside antibodies have been reported but, so far, antibodies targeting LM1-containing ganglioside complexes are the only ones associated to specific clinical features such as ataxia<sup>12</sup>. Anti-ganglioside antibodies were systematically tested in our patients by ELISA and further confirmed with thin-layer chromatography (TLC). Four patients showed IgM antibodies against GM1. Two of them, who also had GD1b IgM antibodies, presented with the Lewis-Sumner variant of CIDP. Previous reports describing the clinical and immunological features of Lewis-Sumner did not find any association with GM1 antibodies or proposed them as a differential feature compared to multifocal motor neuropathy (MMN)<sup>36,37</sup>. Description of clinical-immunological correlations in larger cohorts could clarify if there is a subset of CIDP patients with well-established anti-ganglioside antibody reactivities. Seven patients showed low anti-ganglioside/sulfatide antibody titers, probably without clinical relevance.

Our group and others have used candidate-antigen and unbiased approaches to study proteins of the node of Ranvier as potential targets of the immune response in CIDP<sup>13-15,17</sup>. Devaux's and Yuki's groups described antibodies against nodal proteins in patients with CIDP and Guillain-Barré Syndrome (GBS), including IgG and IgM antibodies against neurofascin, gliomedin, CNTN-1 and NrCAM<sup>13</sup>. Later on, Meinl's group described antibodies against neurofascin in very specific subsets of CIDP (and GBS) patients<sup>14</sup>. Our group published that a small subset of CIDP patients reacted strongly against neurons and that CNTN1 and the CNTN1/CASPR1 complex were the antigens in those patients<sup>15</sup>. Interestingly, these patients showed specific clinical features and poor response to IVIg, likely due to the IgG4 nature of the autoantibodies. We then described that some patients reacting against paranodal structures, harbored IgG4 anti-NF155 antibodies. These patients also showed poor response to IVIg and very specific clinical features<sup>18</sup>. Ever since, other groups have confirmed in independent cohorts the presence of anti-CNTN1 and anti-NF155 antibodies in very specific and infrequent CIDP<sup>19-22</sup>, and passive transfer of anti-CNTN1 IgG4 antibodies has demonstrated to be pathogenic<sup>24</sup>. The presence of antibodies against nodal neurofascins (NF140 and NF186) has been recently associated to specific clinical features, including an interesting association with nephrotic syndrome<sup>16</sup>. However, other nodal antigens such as NrCAM or gliomedin have not been replicated yet. We tried to identify CIDP patients with antibodies against those nodal antigens and the CNTN2/CASPR2 complex and the two subunits of the nodal sodium channel but failed to identify any positive patients in contrast to previous studies. The low frequency of these antibodies may account for some of these disparities; larger cohorts in which systematic autoantibody screening is performed should be studied.

For seronegative CIDP patients we developed a screening approach to identify IgG and IgM antibodies using the three main cellular components of the peripheral nerve: motor neurons, DRG neurons and Schwann cells. A significant number of patients (22/57; 38.6%), showed reactivity against any of the three relevant cellular components (a similar proportion to that found in other studies)<sup>13,38</sup>. Most of them showed exclusive reactivity against a single cell type, but a few reacted against two different cell types. Nine patients reacted strongly against DRG or Schwann cells and deserved inclusion in IP experiments. Presence of high concentrations of immunoglobulins in sera after IVIg treatment, might have contributed to unspecific staining, particularly of the IgG subtype, in our patients' ICC experiments. In order to avoid this bias, as stated in the methods section, patients' and controls' ICC results were compared according to two separate categories: moderate to strong stainings, (including scores two and three respectively) and other stainings (including scores one and zero). The latter category being encompassed by negative samples (0) and samples with irrelevant background staining (1), including those that might have featured an unspecific staining as a consequence of higher immunoglobulin titers after IVIg treatment. Since only samples showing moderate or strong reactivities against peripheral nerve cells were used for IP experiments, IVIg treatment cannot be considered a confounding variable in our study. Frequencies of sera reacting against neural structures did not reach statistical significance, likely due to the small number of controls and to a relatively high proportion of controls showing moderate unspecific staining, but it could be, as has been suggested for anti-ganglioside antibodies, that naturally occurring antibodies targeting nerve structures, are frequent in healthy population<sup>39</sup>. No relevant antigens were identified from the mass spectrometry analysis of the precipitated samples.

Finally we attempted whole nerve IP to discover antigens in typical CIDP patients and found two potential candidates: CD9, a tetraspanin present in the paranode<sup>40</sup>, and LICAM, a protein of the neurofascin family. Unfortunately, we failed to confirm autoantibodies against these two antigens in CIDP. The group of Yuki also screened antibodies against CD9 and other tetraspanins and did not find such autoantibodies in CIDP either<sup>41</sup>.

Although the use of several antigens of murine origin (mammalian expression vectors encoding nodal proteins and neuronal primary cultures) may be considered as a limitation of our study, their utility in previous works and in autoimmune encephalitis encouraged us to pursue novel antigen screening in murine models. Inter-species antigen variability, although minor in terms of sequence homology, may however be very relevant for autoantibody screening purposes. This happens with other nerve antigens such as myelin-associated glycoprotein in polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy or NF155 and should be taken into account in future studies. The use of human neural cells obtained from induced pluripotent stem cells could overcome these technical difficulties<sup>42</sup>. A very interesting study identified a subset of patients with inflammatory neuropathies reacting against human Schwann cells and, thus, set the proof of principle that ICC over Schwann cells in isolation may also be useful for autoantibody screening purposes<sup>38</sup>. One important issue regarding our model is that it uses murine cells or undifferentiated human Schwann cells. The study by Kwa and coworkers used human



Schwann cells obtained from sural nerve biopsies and amputation material. The scarcity of this type of sample precludes routine use of these two cell sources. Exploring novel ways of obtaining differentiated human neural cells would therefore help refining these screening techniques.

Another limitation is that, although our screening approach is valid for any type of antigen, identification with IP and mass spectrometry is only useful for protein antigens and, thus, antigens of lipidic or glucidic nature cannot be identified. Finally, identification of relevant protein antigens with IP and mass spectrometry relies on completeness and accuracy of existing protein databases. Although murine and human protein databases cover a very significant proportion of the proteome, their completeness, accuracy and detail may be insufficient for novel antigens that may have not been studied in any other disease or model, and thus it is difficult to assign relevance to the identified antigens.

CIDP is defined based on broad clinical and electrophysiological criteria that successfully identify patients that may benefit from immunomodulatory therapy. However, the inclusion of patients with diverse clinical features into the same diagnostic category leads to clinical, electrophysiological, radiological and pathological heterogeneity that, in the end, interferes with translational research aimed to identify clinically meaningful biomarkers and, among them, autoantibodies. Our study provides the most comprehensive attempt to discover novel antigenic reactivities in CIDP and shows that the pattern of IgG and IgM reactivity of CIDP patients is heterogeneous and targets diverse nerve proteins and structures, further proving the difficulty in the identification of new biomarkers in this context. Our results may therefore help to understand the disparity in previous reports on autoantibodies in CIDP and supports the idea that larger CIDP registries that attempt to collect and homogenize clinical and biomarker information are very much needed.

## Materials and Methods

**Patients, informed consent and protocol approvals.** Sixty-five consecutive patients fulfilling European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society (EFNS/PNS) diagnostic criteria for CIDP and followed in Hospital de la Santa Creu i Sant Pau were included in this study. Twenty-eight healthy controls were additionally included in our experiments. Serum samples were obtained at inclusion in the study and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until needed. Written informed consents were obtained from all subjects according to the Declaration of Helsinki. Participation in the study was conducted under a protocol approved by the Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. All experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

In regard to experiments involving rats, all experimental procedures were approved by our institution's Service of Animal Experimentation at CSIC-ICCC (Institut Català de Ciències Cardiovasculars). All experiments were performed in accordance with due guidelines and regulations.

**Protocol overview.** The autoantibody screening in our patients was designed as a multi-step process (Supplementary Fig. S1). First, patients' sera were tested for antibodies against gangliosides and against previously described antigens from myelin (MPZ, PMP2) or node of Ranvier; CNTN1, NF155, NrCAM, gliomedin, the CNTN1/CASPR1 and the CNTN2/CASPR2 complexes. Antibodies against the two subunits of the main sodium channel present at the node of Ranvier; NavB1 and NavB2 were also tested. Patients showing positivity towards CNTN1, CNTN1/CASPR1 or anti-NF155 ( $n = 8$ ), all of them except two previously described elsewhere<sup>15,18,43</sup>, were excluded from statistical analysis in screening experiments, and were only used in such experiments as controls. These patients were neither tested in further IP analysis. Only patients harboring no reactivity against previously described antigens ( $n = 57$ ) and healthy volunteers serving as negative controls ( $n = 28$ ) were included in autoantibody screening experiments analysis.

Primary cultures of rat DRG and motor neurons, and a human, undifferentiated, Schwann cell line (ScienCell, CA, USA) were used to screen reactivity against peripheral nerve cells. Patients showing autoantibodies against any of these nerve structures were used for antigen discovery with immunoprecipitation. Sera of five typical CIDP cases were pooled and incubated in IP experiments with whole nerve lysate obtained from rat sciatic nerve and human cauda equina obtained from the IDIBAPS (Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer) neural-tissue bank. Finally, if any candidate antigen was detected in any of the IP experiments, confirmatory experiments with transfected HEK cells encoding the protein of interest, followed.

**Cell cultures.** DRG and motor neurons were isolated and cultured following published protocols with minor modifications<sup>44,45</sup>. Briefly, DRG and spinal cords were dissected from E16 rat embryos and dissociated to a cell suspension in neurobasal medium (Gibco BRL, NY, USA) supplemented with B27 (Gibco BRL, NY, USA), Glutamax (Gibco BRL, NY, USA) and nerve growth factor (NGF) (Invitrogen, CA, USA). After 24 hours plated in glass-coverslips, cytosine arabinoside (ARA-C) (Sigma, MO, USA) and fluorouracil (5-FU) (Sigma MO, USA) were added to the medium to remove fibroblasts in DRG neurons cultures. In both cultures, medium was replaced every other day until reaching motor or DRG neuron full growth.

A commercial human Schwann cell line (ScienCell, CA, USA) was cultured following manufacturer's instructions and plated onto glass coverslips until 70–80% confluence was reached.

**DRG neuron, motor neuron and Schwann cell immunocytochemistry.** Live DRG neurons, Schwann cells and motor neurons were incubated with patients' sera diluted in culture medium. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde (Affymetrix Inc, CA, USA) and incubated with secondary goat anti-human IgG/IgM Alexa Fluor 488 antibody (both by Thermo Fisher Scientific, MA, USA). DRG neurons and Schwann cells were tested against IgG and IgM reactivities, both in patients and controls. Due to the limiting scarcity of rat motor neurons extraction, only patients were tested against IgG in these experiments. Finally, coverslips were mounted with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA). Fluorescence signal intensity was scored



in a 0–3 scale by two independent researchers. Relevant images were obtained with the use of an Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus Corporation, Japan) and processed with ImageJ (U. S. National Institutes of Health, MD, USA).

**Immunoprecipitation.** Sera showing moderate or strong reactivity against peripheral nerve cells were used for IP experiments using the same cell as IP substrate. Protein A and G agarose beads (Invitrogen, CA, USA) were used to isolate sera IgG bound overnight to the antigens in a cell culture extract. Precipitated proteins were detached from the agarose beads with Laemmli buffer (Bio-Rad, CA, USA) with 5% b-mercaptoethanol (Merck, Germany) and separated by electrophoresis. Bands appearing in patients' IP but not in controls were analyzed by mass spectrometry. Proteins were selected as candidate antigens when they fulfilled any of these criteria: protein score > 100, peptide sequence coverage >5% or two or more peptides identified with the absence of the same criteria in the control sample.

A subset of five patients with typical CIDP that did not react against nerve cells was used for IP experiments using rat whole nerve lysate or human cauda equina as the IP substrate following the exact same protocol to analyze precipitated proteins.

**Anti-ganglioside antibody screening.** Fifty-nine patients were screened for the presence of anti-ganglioside antibodies with our institution's diagnostic protocol using ELISA<sup>46</sup> as the general detection method and TLC<sup>47</sup> for confirmatory experiments. Anti-ganglioside antibodies were considered positive at a 1:500 titer. The remaining six CIDP patients in our cohort could not be analyzed due to sample scarcity.

**HEK cell transfection and ICC.** HEK293 cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) with mammalian expression vectors encoding human MPZ, PMP2, gliomedin, CNTN1, CASPR1, CNTN2, CASPR2, NF155, CD9 and L1CAM, and murine NrCAM and NavB1 and NavB2. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde (Affymetrix Inc, CA, USA), permeabilized (if needed) with 0.3% TritonX-100 (Sigma, MO, USA) and blocked. ICC experiments were performed using patients' sera and appropriate primary and secondary antibodies (Supplementary Table S3).

**Statistical analysis.** Fluorescence intensity scores from DRG neurons and Schwann cells IgG and IgM ICC experiments from patients and controls were analyzed by Stata v.13.1 (StataCorp LP, Texas, USA) using contingency analysis with the application of a two-tailed Fisher's exact test, accepting an alpha-level <0.05 to determine significance. Patients' and controls' ICC results in each condition were compared according to two separate categories: moderate to strong staining, including scores two and three, and other stainings. Scores two and three were considered positive, while score one was interpreted as unspecific background staining.

**Data availability.** All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

## References

1. Mathey, E. K. *et al.* Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **86**, 973–985, <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-309697> (2015).
2. Querol, L., Devaux, J., Rojas-García, R. & Illa, I. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: diagnostic and therapeutic implications. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 533–547, <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2017.84> (2017).
3. Van den Bergh, P. Y. K. *et al.* European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur. J. Neurol.* **17**, 356–363 (2010).
4. Brannagan, T. H. Current diagnosis of CIDP: the need for biomarkers. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **16**(Suppl 1), 3–13 (2011).
5. Yan, W. X., Archelos, J. J., Hartung, H.-P. & Pollard, J. D. P0 protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann. Neurol.* **50**, 286–292 (2001).
6. Gabriel, C. M., Gregson, N. A. & Hughes, R. A. Anti-PMP22 antibodies in patients with inflammatory neuropathy. *J. Neuroimmunol.* **104**, 139–46 (2000).
7. Kwa, M. S., van Schaik, I. N., Brand, A., Baas, F. & Vermeulen, M. Investigation of serum response to PMP22, connexin 32 and P(0) in inflammatory neuropathies. *J. Neuroimmunol.* **116**, 220–5 (2001).
8. Makowska, A. *et al.* Immune responses to myelin proteins in Guillain-Barré syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 664–671 (2008).
9. Khalili-Shirazi, A., Atkinson, P., Gregson, N. & Hughes, R. A. Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Neuroimmunol.* **46**, 245–251 (1993).
10. Inglis, H. R., Csurhes, P. A. & McCombe, P. A. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **78**, 419–22 (2007).
11. Kuwahara, M., Suzuki, S., Takada, K. & Kusunoki, S. Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neuroimmunol.* **239**, 87–90 (2011).
12. Kuwahara, M. *et al.* Clinical features of CIDP with LM1-associated antibodies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **84**, 573–5 (2013).
13. Devaux, J. J., Odaka, M. & Yuki, N. Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barré syndrome. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **17**, 62–71 (2012).
14. Man, J. K. *et al.* Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology* **79**, 2241–2248 (2012).
15. Querol, L. *et al.* Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann. Neurol.* **73**, 370–80 (2013).
16. Delmont, E. *et al.* Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* **140**, 1851–1858 (2017).
17. Doppler, K. *et al.* Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain* **139**, 2617–2630 (2016).
18. Querol, L. *et al.* Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology* **82**, 879–86 (2014).
19. Doppler, K. *et al.* Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **86**, 720–8 (2015).



20. Ogata, H. *et al.* Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2**, 960–71 (2015).
21. Miura, Y. *et al.* Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain* **138**, 1484–91, <https://doi.org/10.1093/brain/awv054> (2015).
22. Devaux, J. J. *et al.* Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* **86**, 800–7 (2016).
23. Querol, L. *et al.* Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* **2**, e149, <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000000149> (2015).
24. Manso, C., Querol, L., Mekaouche, M., Illa, I. & Devaux, J. J. Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects. *Brain* **139**, 1700–1712 (2016).
25. Mehndiratta, M. M., Hughes, R. A. C. & Pritchard, J. Plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane database Syst. Rev.* CD003906 <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003906.pub4> (2015).
26. Eftimov, F., Winer, J. B., Vermeulen, M., de Haan, R. & van Schaik, I. N. Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane database Syst. Rev.* **12**, CD001797 (2013).
27. Berger, M., McCallus, D. E. & Lin, C. S.-Y. Rapid and reversible responses to IVIG in autoimmune neuromuscular diseases suggest mechanisms of action involving competition with functionally important autoantibodies. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **18**, 275–296, <https://doi.org/10.1111/jns5.12048> (2013).
28. Dalakas, M. C. & Engel, W. K. Immunoglobulin and Complement Deposits in Nerves of Patients With Chronic Relapsing Polyneuropathy. *Arch Neurol* **37**, 637–640 (1980).
29. Yan, W. X., Taylor, J., Andrias-Kauba, S. & Pollard, J. D. Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Ann. Neurol.* **47**, 765–75 (2000).
30. Csurhes, P. A., Sullivan, A.-A., Green, K., Pender, M. P. & McCombe, P. A. T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**, 1431–9 (2005).
31. Hughes, R. A. C., Allen, D., Makowska, A. & Gregson, N. A. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **11**, 30–46 (2006).
32. Sanvito, L. *et al.* Humoral and cellular immune responses to myelin protein peptides in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **80**, 333–8 (2009).
33. Willison, H. J. & Yuki, N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* **125**, 2591–625 (2002).
34. Ilyas, A. A., Mithen, F. A., Dalakas, M. C., Chen, Z. W. & Cook, S. D. Antibodies to acidic glycolipids in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neurol. Sci.* **107**, 111–21 (1992).
35. van Schaik, I. N., Vermeulen, M., van Doorn, P. A. & Brand, A. Anti-GM1 antibodies in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) treated with intravenous immunoglobulin (IVIg). *J. Neuroimmunol.* **54**, 109–15 (1994).
36. Verschuuren, A. *et al.* Lewis-Sumner syndrome and multifocal motor neuropathy. *Muscle and Nerve* **31**, 88–94 (2005).
37. Rajabally, Y. A. & Chavada, G. Lewis-Sumner syndrome of pure upper-limb onset: Diagnostic, prognostic, and therapeutic features. *Muscle and Nerve* **39**, 206–220 (2009).
38. Kwa, M. S. G. *et al.* Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies. *Brain* **126**, 361–375 (2003).
39. Hernández, A. M. & Rodríguez-Zhurbenko, N. Detection of naturally occurring human antibodies against gangliosides by ELISA. *Methods Mol. Biol.* **1643**, 179–186 (2017).
40. Ishibashi, T. *et al.* Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J. Neurosci.* **24**, 96–102 (2004).
41. Miyaji, K., Paul, F., Shahrizaila, N., Umapathi, T. & Yuki, N. Autoantibodies to tetraspanins (CD9, CD81 and CD82) in demyelinating diseases. *J. Neuroimmunol.* **291**, 78–81 (2016).
42. Harschnitz, O. *et al.* Autoantibody pathogenicity in a multifocal motor neuropathy induced pluripotent stem cell-derived model. *Ann. Neurol.* **80**, 71–88 (2016).
43. Labasque, M. *et al.* Specific contactin N-glycans are implicated in neurofascin binding and autoimmune targeting in peripheral neuropathies. *J. Biol. Chem.* **289**, 7907–18 (2014).
44. Brockes, J. P., Fields, K. L. & Raff, M. C. Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* **165**, 105–18 (1979).
45. Li, R. Culture methods for selective growth of normal rat and human Schwann cells. *Methods Cell Biol.* **57**, 167–86 (1998).
46. Willison, H. J. *et al.* Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Eur. J. Neurol.* **6**, 71–77 (1999).
47. O'Hanlon, G. M. *et al.* Peripheral neuropathy associated with anti-GM2 ganglioside antibodies: clinical and immunopathological studies. *Autoimmunity* **32**, 133–144 (2000).

## Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Laura Casaní and Dr. Sergi Florit at the CSIC-ICCC (Institut Català de Ciències Cardiovasculars) as well as Dr. Ellen Gelpí at the IDIBAPS (Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer) neural tissue bank, for their help with the handling of the animal and human neural samples respectively. We also thank Drs Francesc Graus and Josep Dalmau at the Neuroimmunology-Multiple Sclerosis Unit, Hospital Clínic de Barcelona for providing us with the CASPR-2 vector used in our ICC experiments. This project was supported with two research grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Spain and FEDER; FIS13/00937, principal investigator Isabel Illa and FIS16/00627, principal investigator Luis Querol and by the ACAMIN Project of the E-Rare call of the ERA-NET programme on Rare Diseases. During the course of our study Luis Querol was supported by the Juan Rodes grant JR1300014. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Author Contributions

L.Q., A.M.S., G.N.G. and II designed the study; L.Q., A.M.S., R.A.R., A.J., J.A., G.N.G. and M.N.M. conducted the experiments; J.D., C.F.S. and E.G. provided technical support, experimental advice and reagents; R.R.G., J.D.M. and E.C.V. provided characterized samples; L.Q., A.M.S. and II wrote the manuscript and all authors revised it.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14853-4>.

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017



## RESULTADOS

### MATERIAL SUPLEMENTARIO

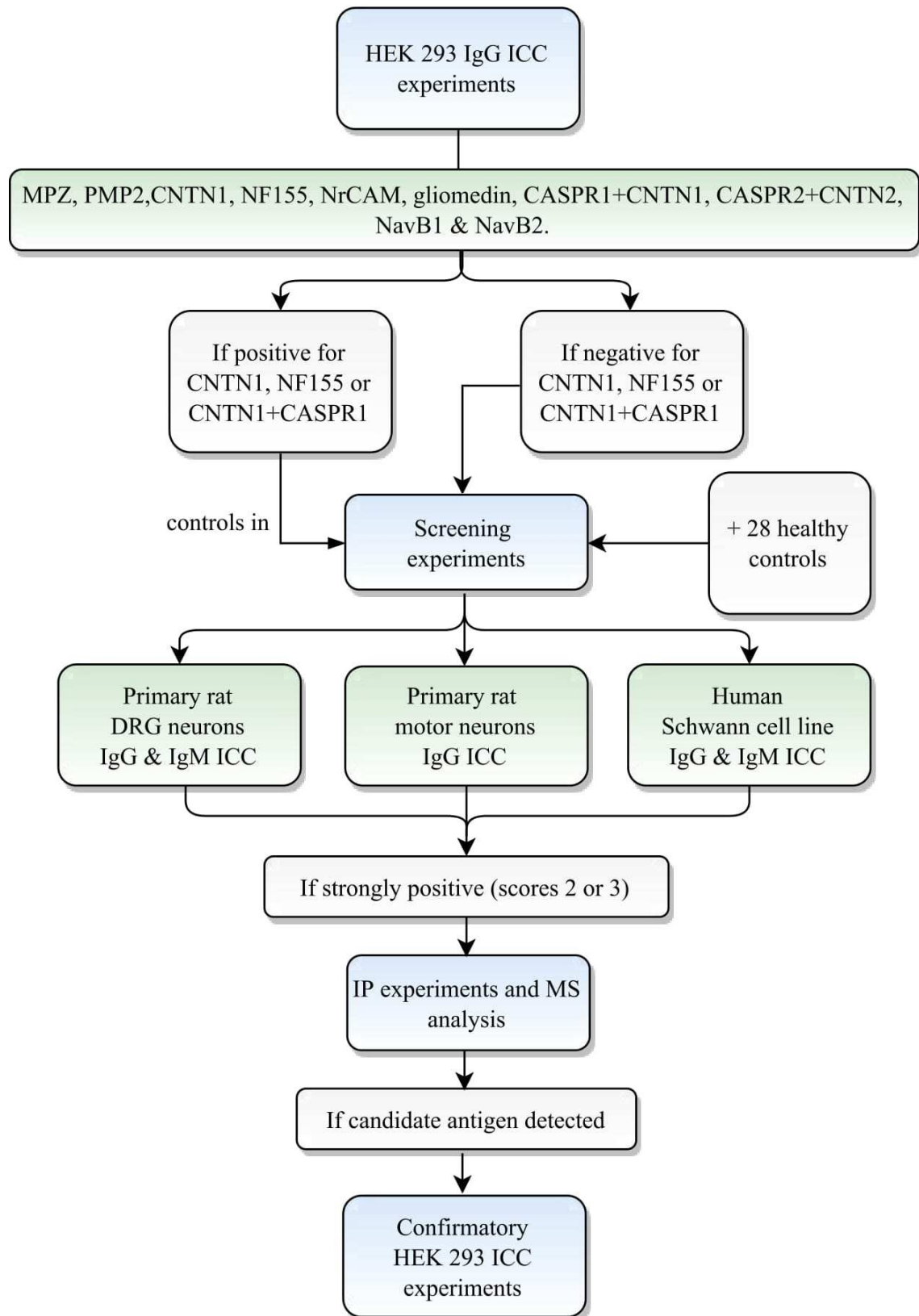
PATIENT ID CODE	AGE	GENDER	CIDP SUBTYPE	PATIENT ID CODE	AGE	GENDER	CIDP SUBTYPE
1	60	M	TYPICAL	34	26	M	ATYPICAL:DADS
2	56	F	TYPICAL	35	62	F	TYPICAL
3	63	M	TYPICAL	36	68	M	TYPICAL
4	ND	M	TYPICAL	37	84	M	ATYPICAL: PURE SENSORY
5	30	F	ATYPICAL: PURE ATAXIC	38	58	M	TYPICAL
6	92	F	ATYPICAL: LEWIS-SUMNER	39	66	M	ATYPICAL:DADS
7	84	M	TYPICAL	40	73	M	TYPICAL
8	55	F	TYPICAL	41	ND	M	TYPICAL
9	79	F	TYPICAL	42	ND	M	TYPICAL
10	80	F	TYPICAL	43	71	F	TYPICAL
11	39	F	TYPICAL	44	82	F	ATYPICAL: PURE SENSORY
12	84	M	ATYPICAL: PURE ATAXIC	45	48	F	TYPICAL
13	77	F	TYPICAL	46	74	F	TYPICAL
14	57	F	TYPICAL	47	66	M	ATYPICAL: LEWIS-SUMNER
15	62	M	TYPICAL	48	53	M	ATYPICAL: LEWIS-SUMNER
16	68	M	TYPICAL	49	54	F	TYPICAL
17	35	M	TYPICAL	50	74	M	ATYPICAL:DADS
18	60	F	ATYPICAL:DADS	51	81	F	TYPICAL
19	37	F	TYPICAL	52	49	F	TYPICAL
20	21	M	ATYPICAL:DADS	53	83	F	ATYPICAL:DADS
21	70	M	TYPICAL	54	68	M	TYPICAL
22	46	M	TYPICAL	55	66	M	ATYPICAL:DADS
23	69	F	ATYPICAL: PURE ATAXIC	56	76	M	TYPICAL
24	69	M	TYPICAL	57	57	F	TYPICAL
25	64	F	ATYPICAL: LEWIS-SUMNER	58	44	M	ATYPICAL: PURE SENSORY
26	75	M	TYPICAL	59	32	F	TYPICAL
27	80	F	TYPICAL	60	60	F	ATYPICAL: LEWIS-SUMNER
28	71	F	TYPICAL	61	ND	F	TYPICAL
29	62	M	TYPICAL	62	92	F	TYPICAL
30	59	M	TYPICAL	63	53	M	TYPICAL
31	66	M	ATYPICAL: LEWIS-SUMNER	64	48	M	ATYPICAL: LEWIS-SUMNER
32	43	M	TYPICAL	65	63	M	TYPICAL
33	71	M	ATYPICAL: LEWIS-SUMNER				

**Supplementary Table S1.** Patients' demographical description. DADS: distal acquired demyelinating symmetric.

## RESULTADOS

PATIENT ID	MOTOR NEURONS IgG	SCHWANN CELLS IgG	SCHWANN CELLS IgM	DRG NEURONS IgG	DRG NEURONS IgM	CNTN1	CNTN1 + CASPR1	NF155	CNTN2+ CASPR2	PMP2	MPZ	Glomedin	NrCAM	NavB1	NavB2	CD9	L1CAM
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	3	0	0	3	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
23	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	3	0	1	3	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	3	1	0	2	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	2	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
62	3	2	0	3	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Supplementary Table S2. All ICC results.



**Supplementary Figure S1.** Autoantibody screening protocol diagram. MS: Mass spectrometry.

## RESULTADOS

cDNA Clone	Protein of interest	Permeabilization	Sera dilution	Blocking solution	Commercial antibody	Commercial antibody dilution	Secondary antibodies	Secondary antibodies dilution
pCMV6-NFASC-Myc-DDK RC228652 (Origene)	<b>NF155</b>	NO	1/100	Goat 5% in PBS	Chicken NF (AF3235 R&D systems)	1/1000	GAC488 (A11039 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/1000+1/1000
pCMV6-CNTN1-untagged EX-A1153-M02 (Genecopoeia)	<b>CNTN-1</b>	NO	1/100	Rabbit 1/40 in PBS	Goat CNTN1 (AF904 R&D systems)	1/1000	RAG488 (A11078 Thermo Scientific) + RAH594 (SA510112 Thermo Scientific)	1/1000+1/1000
pCMV6-CNTN1-untagged EX-A1153-M02 (Genecopoeia) + pCMV6-CNTNAP1-untagged EX-M0417-M02 (Genecopoeia)	<b>CNTN-1+CASPR-1</b>	NO	1/100	Rabbit 1/40 in PBS	Goat CNTN1 (AF904 R&D systems)	1/1000	RAG488 (A11078 Thermo Scientific) + RAH594 (SA510112 Thermo Scientific)	1/1000+1/1000
pCMV6-CNTN2-untagged EX-A1282-M02B (Genecopoeia) + CASPR2 vector kindly provided by Dr. Graus	<b>CNTN-2+CASPR-2</b>	NO	1/100	Goat 5% in PBS	Rabbit CNTN2 (AB133498 Abcam)	1/200	GAR 488 (A11008 Thermo Scientific) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500
in-house MPZ ORF cloned in a pcDNA40 vector (Genecopoeia)	<b>MPZ</b>	YES	1/100	Goat 5% in PBS	Chicken MPZ (LS-C149138LifeSpan BioSciences)	1/200	GAC488 (A11039 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500
in-house PMP2 ORF cloned in a pcDNA40 vector (Genecopoeia)	<b>PMP2</b>	YES	1/40	Goat 5% in PBS	Rabbit anti-PMP2 (12717-1-AP ProteinTech Group)	1/200	GAR 594 (A11037 Thermo Scientific) + GAH488 (A11013 Thermo Scientific)	1/500 +1/500
pIRES-NrCAM-HA courtesy of Drs. Devaux and Faivre-Sarrailh	<b>NrCAM</b>	YES	1/40	Goat 5% in PBS	Rat-anti-HA (11-867-423-001 Roche)	1/2000	GARat 488 (A11006 Thermo Scientific) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500
pcDNA3-Gliomedin-Myc courtesy of Drs. Devaux and Faivre-Sarrailh	<b>gliomedin</b>	YES	1/40	Goat 5% in PBS	Mouse-anti-Myc (CBL430 Millipore)	1/200	GAM 488 (A-11001 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500
pcDNA3-NavB1-HA courtesy of Drs. Devaux and Faivre-Sarrailh	<b>NavB1</b>	YES	1/40	Goat 5% in PBS	Rat-anti-HA (11-867-423-001 Roche)	1/2000	GARat 488 (A11006 Thermo Scientific) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500
pcDNA3-NavB2-Myc courtesy of Drs. Devaux and Faivre-Sarrailh	<b>NavB2</b>	NO	1/40	Goat 5% in PBS	Mouse-anti-Myc (CBL430 Millipore)	1/200	GAM 488 (A-11001 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500
pCMV6-CD9-Myc-DDK RC202000 (Origene)	<b>CD9</b>	NO	1/40	Goat 5% in PBS	Mouse-anti-Myc (CBL430 Millipore)	1/200	GAM 488 (A-11001 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500
pCMV6-L1CAM -Myc-DDK RC211601 (Origene)	<b>L1CAM</b>	YES	1/40	Goat 5% in PBS	Mouse-anti-Myc (CBL430 Millipore)	1/200	GAM 488 (A-11001 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500

**Supplementary Table S3. HEK293 cell transfection and ICC conditions**





## 4.2 ARTÍCULO II

**Annals of Clinical and Translational Neurology. Factor de impacto: 3,901. Primer cuartil.**

## RESEARCH ARTICLE

## Antibodies against cell adhesion molecules and neural structures in paraneoplastic neuropathies

Ana M. Siles<sup>1,2</sup>, Eugenia Martínez-Hernández<sup>2,3</sup>, Josefa Araque<sup>1,2</sup>, Jordi Díaz-Manera<sup>1,2</sup> , Ricard Rojas-García<sup>1,2</sup>, Eduard Gallardo<sup>1,2</sup>, Isabel Illa<sup>1,2</sup>, Francesc Graus<sup>3</sup> & Luis Querol<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Neuromuscular Diseases Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

<sup>3</sup>Service of Neurology and Neuroimmunology, August Pi Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Hospital Clínic, University of Barcelona, Spain

### Correspondence

Luis Querol, Neuromuscular Diseases Unit-Neuromuscular Lab, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Pavillion 17, 1st floor, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.  
Tel: +34 93556 5701; Fax: +34 935565602; Email: lquerol@santpau.cat

### Funding Information

This project was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Spain, and FEDER under grant FIS16/00627, principal investigator Luis Querol.

Received: 9 January 2018; Revised: 21 February 2018; Accepted: 22 February 2018

doi: 10.1002/acn3.554

### Abstract

**Objective:** Paraneoplastic neurological syndromes (PNS) are rare neurological disorders in which ectopic expression of neural antigens by a tumor results in an autoimmune attack against the nervous system. Onconeural antibodies not only guide PNS diagnosis but may also help detecting underlying malignancies. Our project aims to uncover new potential antibodies in paraneoplastic neuropathies (PN). **Methods:** Thirty-four patients fulfilling diagnostic criteria of possible ( $n = 9$ ; 26.5%) and definite ( $n = 25$ ; 73.5%) PN without onconeural antibodies and 28 healthy controls were included in our study. Sera were tested for known antibodies against neural cell adhesion molecules and screened for novel IgG and IgM reactivities against nerve components: dorsal root ganglia (DRG) neurons, motor neurons, and Schwann cells. Patients showing autoantibodies against any of these cell types were used for immunoprecipitation (IP) studies. **Results:** Overall, 9 (26.5%) patients showed significant reactivity against DRG neurons, motor neurons, or Schwann cells, whereas 5 (17.9%) healthy controls only showed moderate reactivity. Compared with control sera, serum samples from patients with paraneoplastic sensory-motor neuropathies had a higher frequency of IgM antibodies against Schwann cells (0% vs. 40%;  $P = 0.0028$ ). No novel antigens were identified from our IP experiments. Antibodies against the neural adhesion molecules CNTN1, NF155, NF140, NF186, NCAM1, L1CAM, and the CNTN1/CASPR1 complex were not detected in patients with PN. One (2.9%) patient with CIDP and thymoma had CASPR2 antibodies. **Interpretation:** Almost 30% of patients with PN harbor antibodies targeting neural structures, suggesting that novel neoplasm-associated antigens remain to be discovered.

### Introduction

Paraneoplastic neurological syndromes (PNS) are heterogeneous and rare neurological disorders in which the ectopic expression of a neural antigen in a neoplasm drives an autoimmune response resulting in neurological impairment.<sup>1</sup> PNS comprise multiple clinical entities that may affect all parts of the nervous system.<sup>1</sup> According to the PNS Euronetwork database, one third of patients with PNS have the peripheral nervous system as the primary site of involvement. Among

peripheral PNS, sensory neuronopathy is the most frequent syndrome.<sup>2</sup>

In PNS, breakage of tolerance against self follows ectopic expression of tumor-expressed antigens, which leads to the production of paraneoplastic or onconeural antibodies.<sup>1</sup> To date, several well-characterized onconeural antibodies have been described,<sup>3</sup> being anti-Hu and anti-Yo antibodies the most frequent.<sup>2</sup> Except for anti-Hu antibodies, which strongly associate with pure sensory neuronopathy, most of these onconeural antibodies associate with central nervous system disorders. Since



neurological symptoms generally precede tumor detection,<sup>4</sup> the finding of circulating onconeural antibodies may be key in guiding what is often a challenging diagnosis.<sup>3</sup> Furthermore, their detection in patients is in some cases invaluable in the discovery of an underlying malignancy, allowing the initiation of an early oncological treatment which might, in turn, contribute to the management of the PNS.<sup>5–8</sup>

Contactin 1 (CNTN1) is an axonal cell adhesion molecule implicated in myelin loops fixation at the paranode of Ranvier.<sup>9</sup> Our group described the presence of anti-CNTN1 antibodies in small subsets of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) patients with characteristic clinical features.<sup>10</sup> Both in vitro and passive-transfer experiments in animal models have demonstrated anti-CNTN1 antibodies' pathogenicity in CIDP.<sup>11</sup> CNTN1 has also been postulated to play a pivotal role in the development, progression, and pathogenesis of multiple tumors, being its expression considered as a marker of poor prognosis.<sup>12–16</sup> Two of our CIDP patients harboring antibodies against CNTN1, respectively, developed a lymphoma and a colon adenocarcinoma in addition to their neuropathy, one of them concomitantly, and the other several years later. The role of other cell adhesion molecules such as neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1)<sup>17–20</sup> and L1 (L1CAM)<sup>21–23</sup> in cancer pathogenesis has been widely described. However, their possible involvement as antigens in paraneoplastic neuropathies has not been studied.

Here, we present a prospective study in which sera from a group of 34 patients fulfilling diagnostic criteria of possible ( $n = 9$ ; 26.5%) and definite ( $n = 25$ ; 73.5%) paraneoplastic neuropathies (PN), according to the PNS Euronetwork criteria,<sup>3</sup> were analyzed to uncover new potential antibodies. Sera were tested for known antibodies against neural cell adhesion molecules and screened for novel reactivities against nerve components.

## Materials and Methods

### Patients, informed consent, and protocol approvals

In this prospective study, 34 patients followed at the Neuroimmunology-Multiple Sclerosis Unit in Hospital Clínic de Barcelona ( $n = 32$ ; 94.1%) or at the Neuromuscular Diseases Unit in Hospital de Sant Pau ( $n = 2$ ; 5.9%) were included. Patients fulfilled diagnostic criteria of possible ( $n = 9$ ; 26.5%) or definite ( $n = 25$ ; 73.5%) PN.<sup>3</sup> Peripheral nerve involvement due to neoplastic infiltration, infectious or metabolic complications, or from any sort of cancer treatment was appropriately ruled out. All patients lacked antibodies against well-characterized

antigens as determined by immunoblot at Hospital Clínic. Twenty-eight healthy controls from the Neuromuscular Diseases Laboratory biobank were additionally included. Serum samples were obtained and frozen at  $-80^{\circ}$  until needed.

This clinical research was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Human Ethics Committees Review Board of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Hospital Clínic de Barcelona. Written informed consents were obtained from all participants.

With regard to experiments involving rats, experimental procedures were approved by our institution's Service of Animal Experimentation at CSIC-ICCC (Institut Català de Ciències Cardiovasculars).

### Protocol overview

Sera were tested for antibodies against previously described antigens at the node of Ranvier; CNTN1,<sup>10</sup> neurofascin 140 (NF140),<sup>24</sup> neurofascin 155 (NF155),<sup>25</sup> neurofascin 186 (NF186),<sup>24</sup> contactin-associated protein 2 (CASPR-2)<sup>26</sup>, and the CNTN1/contactin-associated protein 1 (CASPR1) complex<sup>10</sup>; and against other neural cell adhesion molecules (L1CAM and NCAM1). Sera were additionally screened for novel IgM and IgG reactivities against primary cultures of rat peripheral nerve components: dorsal root ganglia (DRG) neurons, motor neurons, and Schwann cells.

Patients with autoantibodies against any of these nerve structures were used for antigen discovery with immunoprecipitation (IP) studies. If any candidate antigen was detected, confirmatory experiments with transfected human embryonic kidney (HEK) 293 cells were conducted.

### Autoantibody screening in peripheral nerve components: cell cultures

Rat DRG neurons,<sup>27</sup> motor neurons,<sup>28</sup> and Schwann cells<sup>29</sup> were isolated and cultured as previously described with modifications. Briefly, DRG neurons were dissociated from E16 embryos and cells were cultured in neurobasal medium (Gibco BRL, NY) supplemented with B27 (Gibco BRL), Glutamax (Gibco BRL), and nerve growth factor (NGF) (Invitrogen, CA). After 24 h, cytosine arabinoside (ARA-C) (Sigma, MO) and fluorouracil (5-FU) (both by Sigma) were added to the medium to remove fibroblasts. Two-thirds of the ARA-C/5-FU-supplemented medium was replaced with fresh medium every other day until reaching DRG neuron full growth.

Motor neurons were obtained from spinal cords from E16 rat embryos. Cells were cultured in neurobasal



medium (Gibco BRL) supplemented with B27 (Gibco BRL), Glutamax (Gibco BRL), and NGF (Invitrogen). Medium was replaced every other day until full cell growth was achieved.

Schwann cells were harvested from sciatic nerves from 4- to 6-day-old rat pups and cultured in CB-medium overnight (O/N). After 24 h, medium was changed and fresh CB-medium supplemented with ARA-C (Sigma) was added. After 3 days, medium was changed to Schwann cell proliferation medium, which was replaced every other day until full proliferation was achieved. Cells were then plated in Poly-D-Lysine (Sigma) coated cover glasses, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Affymetrix Inc, CA), blocked with 5% goat serum (Gibco BRL) and frozen at -80°C until immunocytochemistry (ICC) experiments were performed.

### **DRG neuron, motor neuron, and Schwann cell immunocytochemistry**

Live DRG and motor neurons were incubated with patients' sera diluted 1/150 (for IgG experiments) or 1/40 (for IgM experiments) in culture medium. Cells were then fixed with 4% PFA (Affymetrix Inc) and incubated with appropriate secondary antibodies (both from Invitrogen) 1/1500. Due to the limiting scarcity of rat motor neurons extraction, only patients' sera were tested in these experiments.

ICC experiments on Schwann cells were performed on previously fixed and blocked frozen cells, using patients' sera diluted 1/100 (for IgG) or 1/40 (for IgM) and 1/1000 secondary antibodies (both from Invitrogen).

Coverslips were mounted with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA) and fluorescence signal intensity was scored in a 0–3 scale by two independent researchers. Participants were codified as patients or controls and their ICC results in each condition were grouped in two separate categories: moderate to strong staining, including scores two and three (relevant staining), and other staining, featuring scores zero (negatives) and mild (score one, unspecific background). The latter category included sera with no immunological relevance. Images were obtained with an Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and processed with GraphPad layout editor (GraphPad Software, CA).

### **Immunoprecipitation**

Sera showing moderate or strong (scores 2 or 3) reactivity against peripheral nerve cells were used for IP experiments using the same cell as IP substrate. Briefly, cells were cultured as described above and incubated 1 h at 37°C with sera diluted 1/100 (for IgG) or 1/40 (for IgM)

in growth medium. Cells were then lysed and protein A and G agarose beads (both by Invitrogen) or anti-human IgM agarose beads (Sigma) were added to the lysate and incubated O/N. Agarose beads were then spun down and the supernatants removed. Precipitated proteins were detached from the agarose beads resuspending the sample in Laemli buffer (Bio-Rad, CA, USA) with 5% b-mercaptoethanol (Merck, Germany), heated up to 100°C for 5 min. Supernatants were then collected, loaded in a polyacrylamide gel for electrophoresis and stained with Coomassie blue (Invitrogen). Bands appearing in the IP material were analyzed by mass spectrometry (MS). Protein relevance as an autoantigen was ranked by a custom software (Anaxomics Biotech, Spain) according to an algorithm taking into account MS protein features (score, number of identified peptides, sequence coverage) and protein's cellular and tissular location and function. Proteins in the IP material were selected as candidate antigens when they fulfilled any of these criteria: protein score > 100, peptide sequence coverage >5%, or two or more peptides identified with the absence of the same criteria in the control sample.

### **HEK cell transfection and ICC**

HEK 293 cells were cultured O/N at 37°C in serum-supplemented Dulbecco's modified Eagle medium (Lonza, Switzerland) in culture dishes with poly-D-coated (Sigma) coverslips. Mammalian expression vectors encoding human CNTN1, CASPR1, CASPR2, NF140, NF155, NF186, NCAM1, and L1CAM (additional information in Table S1) in Opti-MEM (Gibco BRL) were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were then fixed with 4% PFA (Affymetrix Inc) and blocked for 1 h with either 5% goat serum (Gibco BRL) or 1/40 normal rabbit serum (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) in PBS. ICC experiments were performed as described in Table S1. Coverslips were mounted as described above.

### **Clinical-immunological correlations**

Medical records of patients were retrospectively reviewed in order to detect any clinical association with the presence of antibody reactivity. Detailed clinical features (including phenotype at onset, time to nadir, electrophysiological features, and response to therapy) were collected in a coded database to detect clinical-immunological associations.

### **Statistical analysis**

Results were analyzed by GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software). Statistical comparison was performed using

contingency analysis with the application of a two-tailed Fisher's exact test, accepting an alpha-level <0.05 to determine significance. Whenever this analysis could not be performed due to high number of zeros in the equation, a nonapplicable (NA) status was given in place of a *P* value.

## Results

Thirty-four patients with a neuropathy fulfilling diagnostic criteria of possible ( $n = 9$ ; 26.5%) or definite ( $n = 25$ ; 73.5%) PN were included in the study, 8 (23.5%) of them were women, while 26 (76.5%) were males. Mean age was  $62.9 \pm 10.6$  years;  $57.4 \pm 12.1$  years for women and  $64.7 \pm 9.6$  years for men. According to the recommended diagnostic criteria for PNS,<sup>3</sup> 9 (26.5%) patients with a possible diagnosis featured a nonclassical neurological syndrome with presence of a tumor and absence of onconeural antibodies. Patients with a definite diagnosis either had a classical syndrome with a tumor and a lack of antibodies ( $n = 24$ ; 70.6%) or suffered from a tumor and nonclassical syndrome that improved after oncologic therapy ( $n = 1$ ; 2.9%). Overall, 10 (29.4%) patients presented with a tumor and a neuropathy involving both sensory and motor symptoms while lacking any known antigen, while the remaining 24 (70.6%) patients presented with a tumor and a classical sensory neuronopathy. Among the latter, 7 (20.6%) patients were diagnosed with small cell lung cancer (SCLC). The rest of the 27 (79.4%) patients, regardless of their type of symptom, sensory alone or sensory-motor, suffered from a myriad of other malignancies (Fig. S1). Clinical and demographic data are gathered in Table S2.

## Screening experiments

ICC experiments with primary cultures of rat DRG neurons, motor neurons, and Schwann cells were used to identify novel IgG and IgM reactivities against neural components. Overall, 9 (26.5%) patients reacted moderately or strongly against DRG, motor neurons, or Schwann cells, whereas 5 (17.9%) healthy controls reacted only moderately. Since motor neuron staining in all patients was exclusively moderate and poorly significant (only three patients reacted, two of them moderately), and due to the limiting scarcity of rat motor neurons, no controls were tested for reactivity against motor neurons. Patients with moderate and strong staining and their clinical features are summarized in Table 1. Further details regarding the remaining patients can be found in Table S3. When comparing moderate to strong staining intensities between all patients and controls, no significant statistical differences were appreciated in any of our

screening experiments (Fig. 2A; Table S4). Differences were nonetheless observed when stratifying by disease phenotype.

## Patients with sensory-motor neuropathy

In IgM experiments, 12 (35.3%) out of the total of patients reacted against rat Schwann cells; 5 (14.7%) of them featured strong or moderate staining (Fig. 1A). Four (11.8%) out of these five patients, belonged in the cohort of patients with sensory-motor neuropathy ( $n = 10$ ), representing 40.0% of these patients. A higher proportion of patients with sensory-motor neuropathy reacted against Schwann cells in IgM experiments compared to healthy controls ( $P = 0.0028$ ) (Fig. 2; Table S4) and to patients with pure sensory neuronopathy ( $P = 0.0190$ ) (Fig. 3; Table S5). Three (8.8%) of these patients presented with a sensory-motor axonal polyneuropathy with prominent vibratory and joint position sensation involvement. However, shared specific clinical features among them could not be identified. The fourth patient presented with a sensory-motor neuropathy with demyelinating features in the EMG. Clinical features are detailed in Table 1. Sera from two of these patients (with strong reactivity against Schwann cells) and a normal control were used to identify target antigens using Schwann cells as the IP substrate. Unfortunately, no relevant antigens were identified in comparison to the control serum.

Four patients (11.8%) with sensory-motor neuropathy featured IgG reactivity against DRG neurons, 2 (5.9%) of them moderate, while 3 (8.8%) featured IgM reactivity, only 1 (2.9%) of them with moderate staining. Just 1 (2.9%) patient with sensory-motor neuropathy featured moderate IgG motor neurons' staining. These results were not significant when compared to healthy controls (Fig. 2; Table S4) or patients with sensory neuronopathy (Fig. 3; Table S5).

## Patients with pure sensory neuronopathy

Eight patients (23.5%) with sensory neuronopathy, presented IgG reactivity against DRG neurons, 2 (5.9%) of them of a moderate kind (Fig. 1B), while only 2 (5.9%) showed mild IgM reactivity. Sera from these two patients showing moderate IgG reactivity against DRG neurons and a normal control were used to identify target antigens using DRG neurons as the IP substrate. These experiments did not provide any candidate antigens in comparison to the control serum.

Only 1 (2.9%) patient reacting moderately by IgM against Schwann cells and another patient equally reacting against motor neurons were identified in this cohort. No cross-reactivity was found between motor neurons and



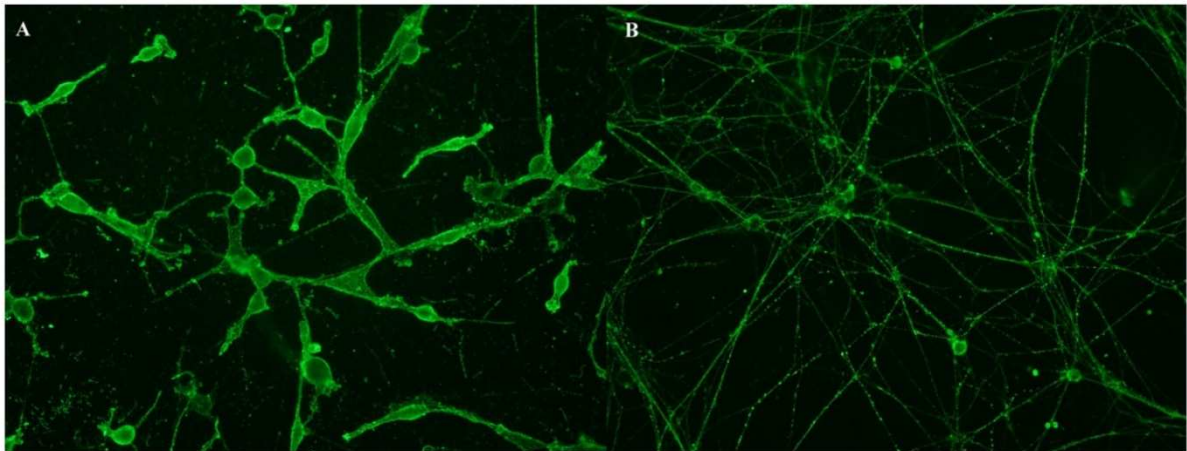
## RESULTADOS

**Table 1.** Patients with moderate or strong staining ICCs.

Patient number	NEUROPATHY	TUMOR	DRG neurons IgG	DRG neurons IgM	Schwann cells IgG	Schwann cells IgM	Motor neurons IgG	Motor neurons IgM	Clinical features
3	Sensory-motor	OVARIAN	2	1	0	1	0	0	Rapidly progressive (over 1 month), predominantly distal, severe limb weakness plus ataxia. Very severe impairment of arthrokynetic and vibration sensation. Areflexia.EMG: Demyelinating features with severe axonal impairment and acute denervation
4	Sensory-motor	LYMPHOMA	1	2	0	3 <sup>1</sup>	0	0	Itch and paresthesia in 3 months. Gait unsteadiness and frequent falls. Mild distal weakness, severe vibration sensation impairment. Sudden progression to severe quadriparesis. Areflexia.EMG: severe sensory-motor axonal polyneuropathy
7	Sensory-motor	BREAST	0	0	0	3 <sup>1</sup>	0	0	One week of weakness and distal paresthesia. Proximal (4/5) and distal (3/5) weakness. Severe vibration and arthrokynetic sensation impairment in all four limbs. Areflexia.EMG: axonal polyneuropathy. Seventeen cells and high protein content in CSF
33	Sensory-motor	COLON	0	0	0	2	0	0	Mild gait impairment 1 year before. Progression in last weeks, with pan-sensory impairment in four limbs. EMG: sensory-motor axonal polyneuropathy. Dramatic improvement after tumor removal
34	Sensory-motor	THYMOMA	3	1	0	2	2	0	Gait impairment, distal sensory disturbances, and distal weakness. EMG: demyelinating features, classified as CIDP. Improvement with steroids
19	Sensory	NSCLC	2 <sup>1</sup>	0	1	0	0	0	Left hand paresthesia. Progression to all limbs, left side of face and trunk. Gait ataxia. Abolition of vibratory sensation in all four limbs. Arthrokinetic sensation impaired in left hand and foot. No weakness. Areflexia. First EMG, normal. Second EMG severe sensory neuronopathy
21	Sensory	TONSIL	0	0	1	2	0	0	Ataxia, paresthesia, vibration sensation impairment, and global areflexia.
30	Sensory	NSCLC	2 <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	Distal painful paresthesia in hands and feet. EMG: sensory axonal polyneuropathy
31	Sensory	PAROTID GLAND	0	1	1	0	1	2	Radicular pain in legs. Paresthesia in four limbs and trunk. Progression over 3 weeks to inability to walk. Severe impairment of joint position. High protein content in CSF

NSCLC, non-small-cell lung cancer; EMG, electromyography; CSF, cerebrospinal fluid.

<sup>1</sup>Indicate sera used for antigen discovery with immunoprecipitation (IP) studies.



**Figure 1.** Positive reactivities in screening ICC experiments. Strong IgM staining in Schwann cells (A) and moderate IgG staining in DRG neurons (B).

DRG neurons or Schwann cells. Significant differences were not observed in these patients when compared to healthy controls (Fig. 2; Table S4) or patients with sensory-motor neuropathy (Fig. 3; Table S5).

#### Reactivity against cell adhesion molecules

No sera reacting against CNTN1, NF155, NF140, NF186, NCAM1, L1CAM, or the CNTN1/CASPR1 complex were identified in our study. Only 1 (2.9%) patient reacted against CASPR2 (Fig. S2). This patient had a thymoma and presented with a sensory-motor rapidly progressing chronic polyradiculoneuropathy with demyelinating features in the EMG, fulfilling diagnostic criteria of CIDP. This patient did not show any evidence of neuromyotonia (frequently associated with anti-CASPR2 antibodies and thymoma<sup>26</sup>) and also reacted against DRG neurons and Schwann cells.

#### Discussion

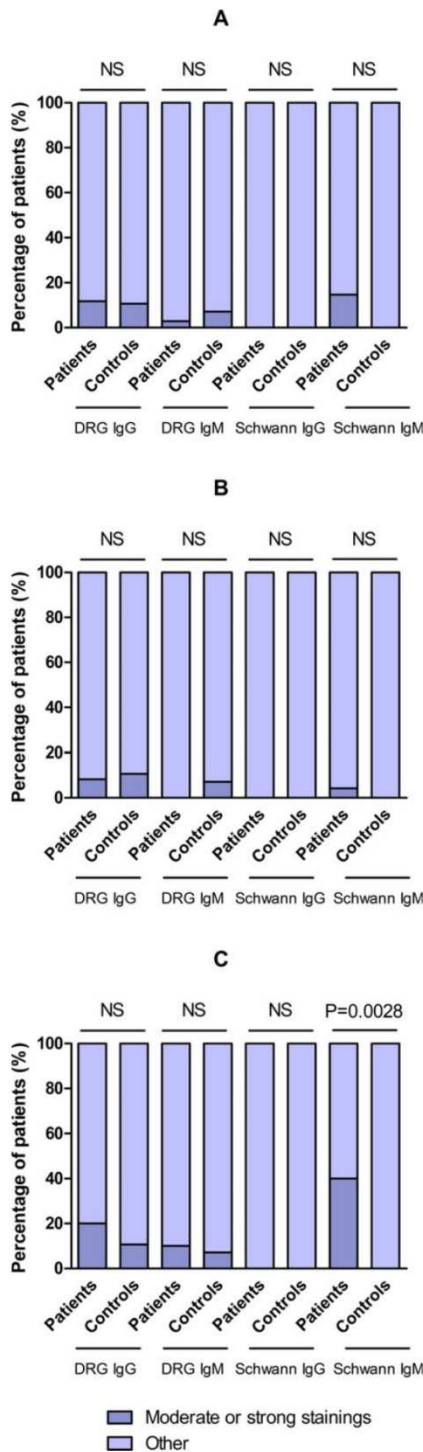
Although our study describes a comprehensive autoantibody screening approach aimed at identifying clinically relevant antigens in PN and provides evidence of the immunopathological diversity in these patients, our experiments failed to identify novel antigens in PN and strong clinical-immunological associations could neither be drawn from our study. Disease heterogeneity and reduced number of patients might be accountable for these results.

Patients with sensory-motor PN featured IgM antibodies targeting Schwann cells more frequently than healthy controls (40% vs. 0%,  $P = 0.0028$ ). Two of these patients

with a lymphoma and a breast adenocarcinoma were used for IP experiments. IgM autoantibodies are not systematically screened in most autoimmune diseases. However, several relevant autoantibodies in nonparaneoplastic inflammatory neuropathies are of the IgM isotype. This includes anti-MAG antibodies associated to monoclonal gammopathy of unknown significance and plasma cell dyscrasias,<sup>30</sup> anti-GM1 antibodies in multifocal motor neuropathy<sup>31</sup>, and anti-disialosyl antibodies in CANOMAD syndrome.<sup>32</sup> Four out of 10 patients with sensory-motor neuropathy stained Schwann cells. All of them had an aggressive onset, three of them with predominantly axonal features in the EMG. However, clear clinical-immunological correlations could not be inferred from our findings. Technical caveats limit the efficiency of IP experiments with IgM antibodies and patients with sensory-motor PN are extremely rare. However, this specific association will deserve attention and dedicated antigen search using different approaches in future studies.

Almost 30% of patients reacted moderately or strongly against neural structures; DRG neurons, motor neurons, or Schwann cells. This may imply that the immune response in PN is heterogeneous and directed toward diverse antigens. However these results might reflect the heterogeneity of cancer types and neuropathies present in our cohort. A high proportion of healthy controls (17.9%) reacted moderately against the same structures, precluding any further interpretation of these findings.

Our study did not identify patients harboring antibodies against neural cell adhesion molecules other than the previously described CASPR2. Although the role of neural cell adhesion molecules has been widely described to contribute to cancer pathogenesis<sup>17-23</sup> and nonparaneoplastic



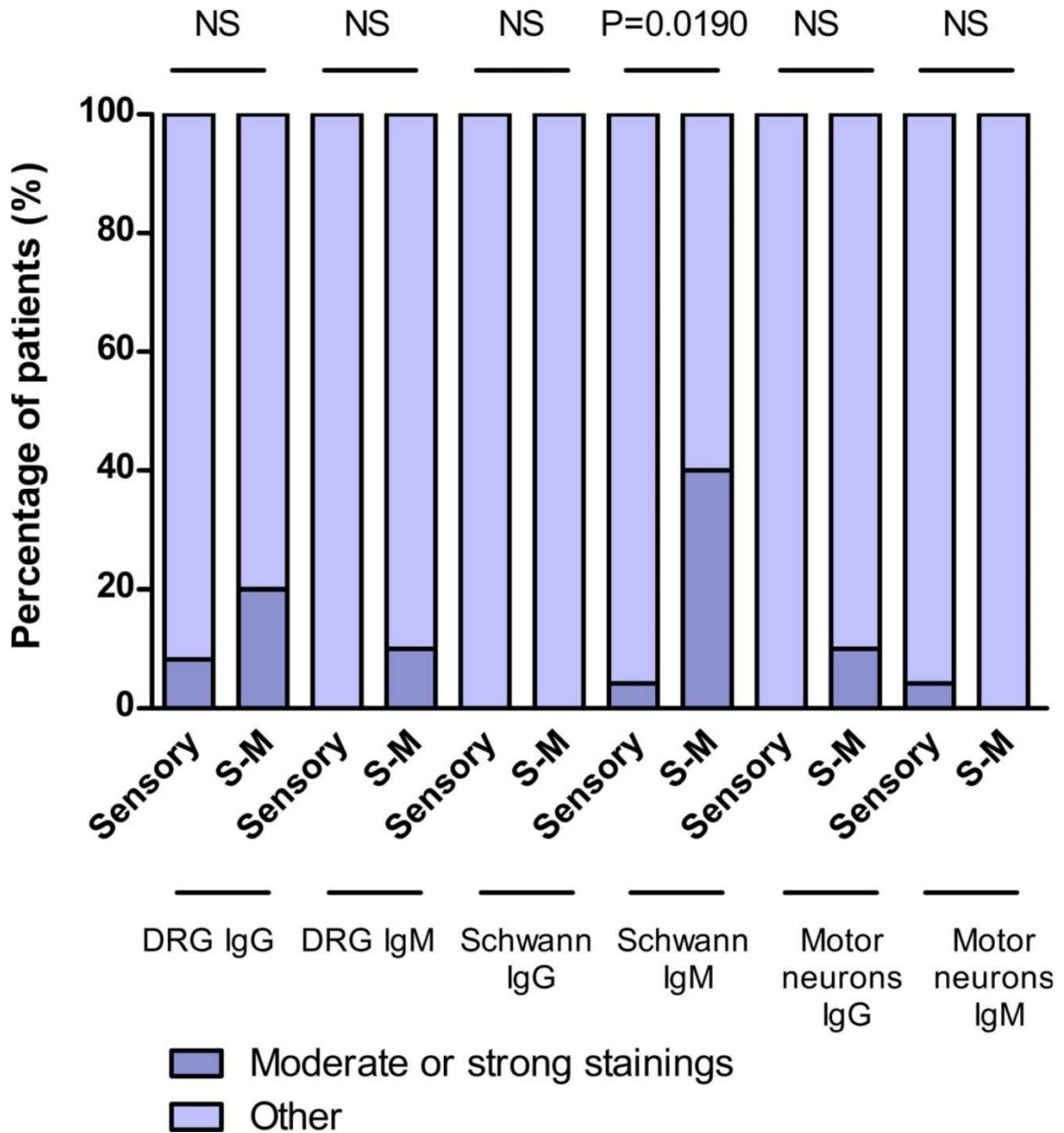
**Figure 2.** Statistical comparison between patients and controls. Statistical analysis of DRG and Schwann cells ICC considering moderate or strong staining in all patients (A); patients with sensory neuropathy (B) and patients with sensory-motor (S-M) neuropathy (C).

autoimmune neuropathies,<sup>10,24,25</sup> the results in our study suggest that nerve damage in our cohort cannot be attributed to a humoral autoimmune attack targeting L1CAM and NCAM1 or the nodal/paranodal CNTN1/CASPR1 complex, CNTN1, NF140, NF155, or NF186. However, this lack of antibodies should be confirmed in further studies involving other cohorts of PN. Anti-CASPR2 antibodies associate with neuromyotonia, limbic encephalitis, and Morvan syndrome in patients with or without thymoma.<sup>33</sup> Our CASPR2-positive patient presented a sensory-motor neuropathy with demyelinating features in the EMG and no evidence of central nervous system involvement or neuromyotonia. This patient also showed relevant IgG staining in motor and DRG neurons experiments and IgM staining in Schwann cells, probably reflecting the promiscuous immune response associated with the thymoma.

In PNS, 70–80% of cases of subacute sensory neuropathy associate with SCLC, most of them boasting anti-Hu antibodies. However, small subsets of patients may present with anti-amphiphysin or anti-CV2 antibodies (with or without anti-Hu antibodies) or with no antibodies at all.<sup>34</sup> In our study, 24 (70.6%) patients with a definite diagnosis of PNS presented with a classical sensory neuropathy with a tumor and a lack of onconeural antibodies. As most paraneoplastic pure sensory neuropathies (neuronopathies) result from damage to the DRG,<sup>4</sup> our hypothesis in such patients were focused on depicting impaired IgG/IgM autoimmune reactivity against DRG neurons as previously described.<sup>35,36</sup> However, interestingly, statistical results showed no significant differences in such cells between those patients and healthy controls or patients with sensory-motor neuropathy in any of the tested conditions. Two of our patients with pure sensory neuropathy and non-small-cell lung cancer showed moderate IgG staining against DRG neurons and were used for IP experiments. Unfortunately, no target antigens were identified from those experiments.

Since the description of anti-Hu antibodies in 1985,<sup>35</sup> and following the identification of other highly specific onconeural antibodies in the serum of PNS patients,<sup>37–43</sup> current hypotheses suggest an autoimmune origin in PNS.<sup>1</sup> According to the location of the antigen, two types of antibodies have been described in these conditions: antibodies targeting cell membrane antigens or antibodies against intracellular antigens, being the latter defined as onconeural.<sup>44</sup> In our study, antibody screening ICC experiments and IP experiments were conducted in non-permeabilizing conditions. Consequently, our search for novel antigens was exclusively catered toward the detection of cell surface molecules, which was further confirmed by the membrane-staining patterns observed in our results. Although no surface antigens were identified





**Figure 3.** Statistical comparison between PN patients with sensory neuropathy and patients with sensory-motor neuropathy. Statistical analysis of DRG neurons, motor neurons, and Schwann cells ICC considering moderate or strong staining in patients with sensory neuropathy and patients with sensory-motor (S-M) neuropathy.

in our IP experiments, a role for intracellular antigens in our patients cannot be ruled out and further comprehensive studies involving intracellular antigen screening techniques should be conducted to address that search. Another limitation in our study is the lack of inclusion of

a control group with sera from patients with cancer but without neurologic involvement. Such approach was not taken into consideration in this study due to the exploratory nature of our work and to the general negativity of our results when compared against healthy controls.



The use of antigens of nonhuman origin might be considered as a limitation in our study. Nonetheless, the use of both mammalian expression vectors encoding nodal proteins and neuronal primary cultures of murine origin has previously provided us with relevant results.<sup>10,25</sup> Despite major sequence homology, interspecies variability may be relevant enough to hinder novel antigen identification. Thus, exploring novel viable sources of obtaining differentiated human neural cells would greatly benefit the search of new antigens, as has been proven in nonparaneoplastic autoimmune neuropathies.<sup>45,46</sup> Another limitation in our study includes the lack of identification of antigens of lipidic or glucidic nature. Last, identification of relevant protein antigens using these techniques relies on completeness and accuracy of existing databases, which may be biased in terms of describing novel candidates. We used a custom software setting a priori criteria to overcome this bias, however no novel antigens could be identified from our IP studies.

In summary, we provide experimental evidence of the heterogeneous IgG and IgM reactivity profile in PN patients. Immunopathological diversity and reduced numbers in our cohorts may have hindered identification of novel antigens. However, a significant proportion of PN patients in our study harbor antibodies targeting neural structures, which may suggest that novel neoplasm-associated antigens remain to be discovered.

### Acknowledgments

The authors thank Dr. Laura Casan and Dr. Sergi Florit at the CSIC-ICCC (Institut Català de Ciències Cardiovasculars) for their help with the handling of the animal samples. We also thank Dr Jerome Devaux, at the CNRS-Aix-Marseille Universit for providing us with the NF140 and NF186 vectors used in our ICC experiments. The authors would like to acknowledge the Department of Medicine at the Universitat Autnoma de Barcelona. This project was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Spain and FEDER under grant FIS16/00627, principal investigator Luis Querol.

### Author contributions

AMS, II, FG, and LQ designed the study; AMS, JA, and LQ conducted the experiments; EG provided technical support, experimental advice and reagents; EM, JD, RR, and FG provided characterized samples; AMS, LQ, and II wrote the manuscript and all authors revised it.

### Conflict of Interest

The authors report no conflict of interest.

### References

1. Darnell R, Posner J. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 2003;349:1543–1554.
2. Giometto B, Grisold W, Vitaliani R, et al. Paraneoplastic neurologic syndrome in the PNS Euronetwork database: a European study from 20 centers. *Arch Neurol* 2010;67:330–335
3. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1135–1140
4. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin Oncol* 2006;33:270–298.
5. Vedeler CA, Antoine JC, Giometto B, et al. Management of paraneoplastic neurological syndromes: report of an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2006;13:682–690.
6. Graus F, Dalmau J. Paraneoplastic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2013;26:489–495.
7. Didelot A, Honnorat J. Paraneoplastic disorders of the central and peripheral nervous systems. *Handb Clin Neurol* 2014;121:1156–1179.
8. Muppidi S, Vernino S. Paraneoplastic neuropathies. *Continuum (Minneap. Minn)*. 2014;20(5 Peripheral Nervous System Disorders):1359–1372.
9. Boyle MET, Berglund EO, Murai KK, et al. Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* 2001;30:385–397.
10. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, et al. Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 2013;73: 370–380.
11. Manso C, Querol L, Mekaouche M, et al. Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects. *Brain* 2016;139(Pt 6):1700–1712.
12. Wu HM, Cao W, Ye D, et al. Contactin 1 (CNTN1) expression associates with regional lymph node metastasis and is a novel predictor of prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2012;6:265–270.
13. Yu JW, Wu SH, Lu RQ, et al. Expression and significances of contactin-1 in human gastric cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2013;2013:210205.
14. Zhang R, Yao W, Qian P, et al. Increased sensitivity of human lung adenocarcinoma cells to cisplatin associated with downregulated contactin-1. *Biomed Pharmacother* 2015;71:172–184.
15. Shi K, Xu D, Yang C, et al. Contactin 1 as a potential biomarker promotes cell proliferation and invasion in thyroid cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:12473–12481
16. Yan J, Ojo D, Kapoor A, et al. Neural cell adhesion protein CNTN1 promotes the metastatic progression of prostate cancer. *Cancer Res* 2016;76:1603–1614.

17. Perl A-K, Dahl U, Wilgenbus P, et al. Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic  $\beta$  tumor cells. *Nature* 1999;5:286–291.
18. Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M, Christofori G. NCAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol* 2001;3:650–657.
19. Bussolati B, Grange C, Bruno S, et al. Neural-cell adhesion molecule (NCAM) expression by immature and tumor-derived endothelial cells favors cell organization into capillary-like structures. *Exp Cell Res* 2006;312: 913–924
20. Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *J Clin Invest* 2016;126:1538–1554.
21. Kiefel H, Bondong S, Hazin J, et al. L1CAM: A major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adhes Migr* 2012;6:374–384.
22. Valiente M, Obenauf AC, Jin X, et al. Serpins promote cancer cell survival and vascular Co-option in brain metastasis. *Cell* 2014;156:1002–1016.
23. Samatov TR, Wicklein D, Tonevitsky AG. L1CAM: cell adhesion and more. *Prog Histochem Cytochem* 2016;51:25–32
24. Delmont E, Manso C, Querol L, et al. Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 2017;140:1851–1858.
25. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, et al. Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology* 2014;82:879–886.
26. Lancaster E, Huijbers MGM, Bar V, et al. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol* 2011;69:303–311.
27. Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc* 2007;2:152–160.
28. Gingras M, Gagnon V, Minotti S, et al. Optimized protocols for isolation of primary motor neurons, astrocytes and microglia from embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci Methods* 2007;163:111–118.
29. Brockes JP, Fields KL, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 1979;165: 105–118.
30. Magy L, Kaboré R, Mathis S, et al. Heterogeneity of polyneuropathy associated with Anti-MAG antibodies. *J Immunol Res* 2015;2015:450391.
31. Pestronk A, Cornblath DR, Ilyas AA, et al. A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 1988;24:73–78.
32. Willison HJ, O’Leary CP, Veitch J, et al. The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 2001;124(Pt 10):1968–1977.
33. van Sonderen A, Arino H, Petit-Pedrol M, et al. The clinical spectrum of Caspr2 antibody-associated disease. *Neurology* 2016;87:521–528.
34. Antoine J, Camdessanche J. Paraneoplastic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2017;30:513–520.
35. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology* 1985;35:538–543.
36. Dalmau J, Furneaux HM, Rosenblum MK, et al. Detection of the anti-Hu antibody in specific regions of the nervous system and tumor from patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *Neurology* 1991;41:1757–1764.
37. Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, et al. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol* 1991;29:241–251.
38. Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology* 1992;42:1931–1937.
39. Folli F, Solimena M, Cofell R, 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: 546–551.
40. Honnorat J, Antoine JC, Derrington E, et al. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61:270–278.
41. Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, et al. A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Engl J Med* 1999;340:1788–1795.
42. Bernal F, Shams’ili S, Rojas I, et al. Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin’s disease. *Neurology* 2003;60:230–234.
43. Sabater L, Titulaer M, Saiz A, et al. SOX1 antibodies are markers of paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 2008;70:924–928.
44. Steck A, Yuki N, Graus F. Antibody testing in peripheral nerve disorders. *Handb Clin Neurol* 2013;115:189–212. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52902-2.00011-4>
45. Harschnitz O, van den Berg LH, Johansen LE, et al. Autoantibody pathogenicity in a multifocal motor neuropathy induced pluripotent stem cell-derived model. *Ann Neurol* 2016;80:71–88.
46. Clark AJ, Kaller MS, Galino J, et al. Co-cultures with stem cell-derived human sensory neurons reveal regulators of peripheral myelination. *Brain* 2017;140:898–913.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

**Table S1.** HEK293 cell transfection and ICC conditions.

**Table S2.** Patients' clinical and demographic data.

**Table S3.** All ICC results.

**Table S4.** Statistical analysis of DRG neurons and Schwann cells ICC in PN patients and healthy controls.

**Table S5.** Statistical analysis of DRG neurons, Schwann cells, and motor neurons ICC in PN patients with sensory neuropathy or sensory-motor neuropathy.

**Figure S1.** Study cohorts.

**Figure S2.** Positive CASPR2 ICC.

## RESULTADOS

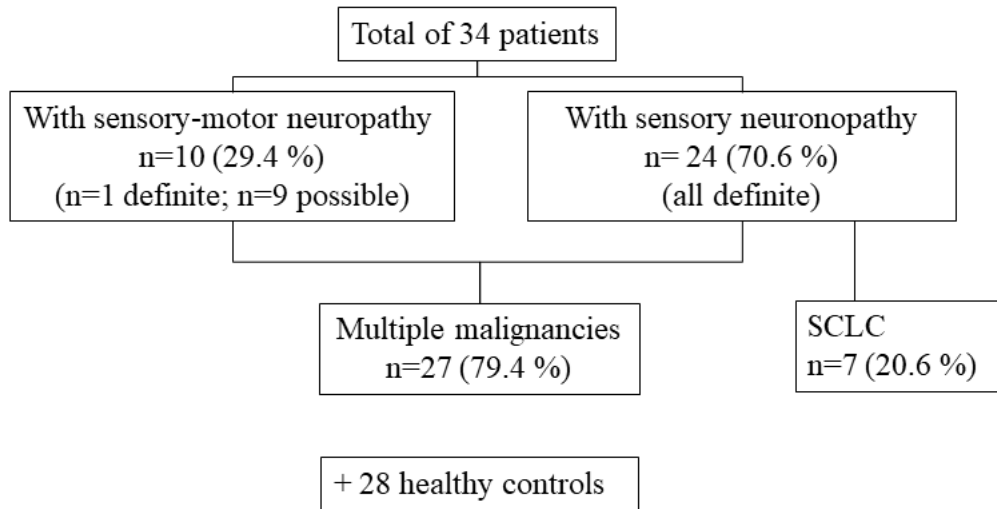
### MATERIAL SUPLEMENTARIO

cDNA Clone	Protein of interest	Permeabilization	Sera dilution	Blocking solution	Commercial antibody	Commercial antibody dilution	Secondary antibodies	Secondary antibodies dilution
NF140 vector courtesy of Dr. Devaux	<b>NF140</b>	No	1/100	Goat 5% in PBS	Chicken NF (AF3235 R&D systems)	1/1000	GAC488 (A11039 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/1000+1/1000
pCMV6-NFASC-Myc-DDK (RC228652 Origene)	<b>NF155</b>	No	1/100	Goat 5% in PBS	Chicken NF (AF3235 R&D systems)	1/1000	GAC488 (A11039 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/1000+1/1000
NF186 vector courtesy of Dr. Devaux	<b>NF186</b>	No	1/100	Goat 5% in PBS	Chicken NF (AF3235 R&D systems)	1/1000	GAC488 (A11039 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/1000+1/1000
pCMV6-CNTN1-untagged (EX-A1153-M02 Genecopoeia)	<b>CNTN1</b>	No	1/100	Rabbit 1/40 in PBS	Goat CNTN1 (AF904 R&D systems)	1/1000	RAG488 (A11078 Thermo Scientific)+ RAH594 (SA510112 Thermo Scientific)	1/1000+1/1000
pCMV6-CNTN1-untagged (EX-A1153-M02 Genecopoeia) + pCMV6-CNTNAP1-untagged (EX-M0417-M02 Genecopoeia)	<b>CNTN1+CASPR1</b>	No	1/100	Rabbit 1/40 in PBS	Goat CNTN1 (AF904 R&D systems)	1/1000	RAG488 (A11078 Thermo Scientific)+ RAH594 (SA510112 Thermo Scientific)	1/1000+1/1000
CASPR2 vector courtesy of Dr. Graus	<b>CASPR2</b>	Yes	1/40	Goat 5% in PBS	Rabbit CASPR-2 (Ab33994 Abcam)	1/500	GAR 488 (A11008 Thermo Scientific)+ GAH 594 (Ab98621 Abcam)	1/1000+1/1000
pCMV6-L1CAM-Myc-DDK (RC211601 Origene)	<b>L1CAM</b>	Yes	1/100	Goat 5% in PBS	Mouse-anti-Myc (CBL430 Millipore)	1/200	GAM 488 (A-11001 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500
pCMV6-NCAM1-C-His (EX-X0019-M77 Genecopoeia)	<b>NCAM1</b>	No	1/100	Goat 5% in PBS	Mouse NCAM (347740 BD Biosciences)	1/1000	GAM 488 (A-11001 Molecular Probes) + GAH594 (Ab98621 Abcam)	1/500 +1/500

**Supplementary Table 1.** HEK293 cell transfection and ICC conditions.



## RESULTADOS



**Supplementary Figure 1.** Study cohorts

Patient number	Neuropathy	Tumor	Gender	Age	Patient number	Neuropathy	Tumor	Gender	Age
1	Sensory-Motor	GASTRIC	M	46	18	Sensory	NSCLC	M	66
2	Sensory-Motor	BLADDER	M	65	19	Sensory	NSCLC	M	72
3	Sensory-Motor	OVARIAN	F	67	20	Sensory	MELANOMA	M	84
4	Sensory-Motor	LYMPHOMA	M	69	21	Sensory	TONSIL	M	60
5	Sensory-Motor	COLON	M	71	22	Sensory	PELVIC	F	79
6	Sensory-Motor	SEMINOMA	M	73	23	Sensory	NSCLC	M	65
7	Sensory-Motor	BREAST	F	52	24	Sensory	PROSTATE	M	69
8	Sensory-Motor	NSCLC	M	NA	25	Sensory	NSCLC	M	77
9	Sensory	SCLC	M	69	26	Sensory	LYMPHOMA	M	56
10	Sensory	SCLC	M	52	27	Sensory	PROSTATE	M	65
11	Sensory	SCLC	M	64	28	Sensory	NSCLC	M	60
12	Sensory	SCLC	M	43	29	Sensory	LYMPHOMA	M	64
13	Sensory	SCLC	M	51	30	Sensory	NSCLC	F	48
14	Sensory	SCLC	M	69	31	Sensory	PAROTID GLAND	M	76
15	Sensory	SCLC	M	62	32	Sensory	MELANOMA	F	46
16	Sensory	GASTRIC	M	70	33	Sensory-Motor	COLON	F	59
17	Sensory	NSCLC	F	64	34	Sensory-Motor	INVASIVE THYROMA	F	44

**Supplementary Table 2.** Patients' clinical and demographic data. SCLC: small cell lung cancer, NSCLC: non-small cell lung cancer, NA: not available.

## RESULTADOS

PATIENT NUMBER	L1CAM	NCAM1	CNTN-1	CNTN1+ CASPR1	NF140	NF155	NF186	CASPR-2	DRG neurons IgG	DRG neurons IgM	Schwann cells IgG	Schwann cells IgM	Motor neurons IgG	Motor neurons IgM
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	3	3	1	0	2	2	0

**Supplementary Table 3.** All ICC results.



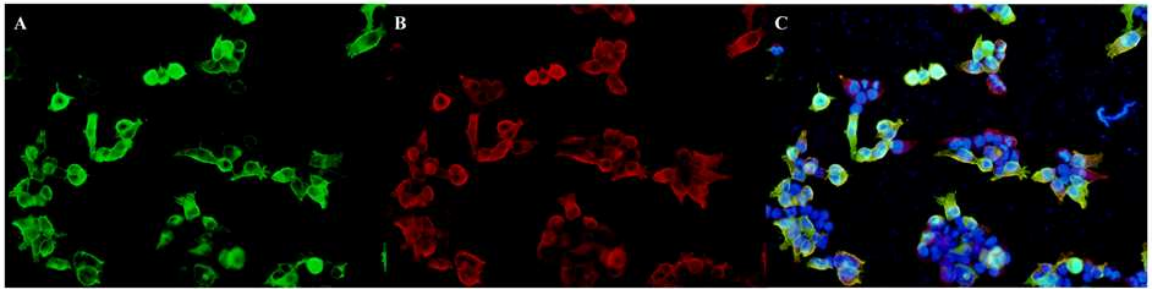
RESULTADOS

		Patients	Controls	P value
All patients	DRG neurons IgG ICC	4/34 (11.8%)	3/28 (10.7%)	1
	DRG neurons IgM ICC	1/34 (2.9%)	2/28 (7.1%)	0.5847
	Schwann cells IgG ICC	0/34 (0%)	0/28 (0%)	NA
	Schwann cells IgM ICC	5/34 (14.7%)	0/28 (0%)	0.0582
Patients with sensory neuropathy	DRG neurons IgG ICC	2/24 (8.3%)	3/28 (10.7%)	1
	DRG neurons IgM ICC	0/24 (0%)	2/28 (7.1%)	0.4932
	Schwann cells IgG ICC	0/24 (0%)	0/28 (0%)	NA
	Schwann cells IgM ICC	1/24 (4.2%)	0/28 (0%)	0.4615
Patients with S-M neuropathy	DRG neurons IgG ICC	2/10 (20.0%)	3/28 (10.7%)	0.5921
	DRG neurons IgM ICC	1/10 (10.0%)	2/28 (7.1%)	1
	Schwann cells IgG ICC	0/10 (0%)	0/28 (0%)	NA
	Schwann cells IgM ICC	4/10 (40.0%)	0/28 (0%)	<b>0.0028</b>

**Supplementary Table 4.** Statistical analysis of DRG neurons and Schwann cells ICC in PN patients and healthy controls. Moderate to strong fluorescence intensity scores, including scores two and three, and other stainings, featuring scores zero and one, from DRG neurons and Schwann cells IgG and IgM ICC experiments from patients and controls were analyzed using contingency analysis with the application of a two-tailed Fisher's exact test, accepting an alpha-level <0.05 to determine significance.

	Sensory	Sensory-Motor	P value
DRG neurons IgG ICC	2/24 (8.3%)	2/10 (20.0%)	0.5636
DRG neurons IgM ICC	0/24 (0%)	1/10 (10.0%)	0.2941
Schwann cells IgG ICC	0/24 (0%)	0/10 (0%)	NA
Schwann cells IgM ICC	1/24 (4.2%)	4/10 (40.0%)	<b>0.0190</b>
Motor neurons IgG ICC	0/24 (0%)	1/10 (10.0%)	0.2941
Motor neurons IgM ICC	1/24 (4.2%)	0/10 (0%)	1

**Supplementary Table 5.** Statistical analysis of DRG neurons, Schwann cells and motor neurons ICC in PN patients with sensory neuropathy or sensory-motor neuropathy. Moderate to strong fluorescence intensity scores, including scores two and three, and other stainings, featuring scores zero and one, from DRG neurons, motor neurons and Schwann cells IgG and IgM ICC experiments were analyzed using contingency analysis with the application of a two-tailed Fisher's exact test, accepting an alpha-level <0.05 to determine significance.



**Supplementary Figure 2. Positive CASPR2 ICC.** HEK293 cells were transfected with a mammalian expression vector encoding CASPR2 with the use of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668019) and ICC was performed as described in Supplementary Table 5. Commercial antibody staining can be appreciated in green (A), patient's 34 sera positivity in red (B), and a merged picture of both can be found above with nuclei stained in blue (C).



A microscopic image of a neural network, showing a dense web of interconnected neurons. The neurons are stained in shades of blue and white, with some cell bodies appearing as larger, darker blue spheres. The background is a light blue color. The text is overlaid on the bottom right of the image.

# 5. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN



### SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 ARTÍCULO I

##### 5.1.1 SÍNTESIS DE RESULTADOS

La CIDP es un síndrome inflamatorio crónico del nervio periférico que engloba múltiples variantes clínicas y que representa la neuropatía autoinmune crónica más frecuente. Aunque su patogenia sigue siendo desconocida, se le atribuye un origen autoinmune. La evidencia de depósitos de inmunoglobulinas y de complemento en el nervio de estos pacientes, la desmielinización observada en modelos animales tras la inmunización con suero de individuos afectados y la respuesta clínica a terapias inmunomoduladoras (IgIV, recambio plasmático y terapias depletivas de células B) sugieren que la inmunidad humoral, y en particular los autoanticuerpos, juegan un papel fundamental en el desarrollo de la patología. La detección de estos anticuerpos puede llegar a tener una gran relevancia clínica tanto para el diagnóstico como la prognosis y el manejo terapéutico de estos pacientes.

La búsqueda de nuevos antígenos es un tema de investigación recurrente en la CIDP. Dada la naturaleza desmielinizante de la enfermedad, y su homología con el SGB, los primeros esfuerzos se centraron en evaluar el potencial antigénico de los gangliósidos y las proteínas de la mielina. A pesar de la descripción de algunas reactividades (como P0, P2 y PMP22), la falta de correlaciones clínico-inmunológicas y de replicabilidad de estos hallazgos orientaron la búsqueda de antígenos a otras estructuras del nervio periférico. El NdR representa una estructura esencial para la correcta conducción nerviosa en la cual se han descrito varios antígenos potenciales en la CIDP. Los primeros autoanticuerpos con relevancia clínica en esta enfermedad, asociados a variantes clínicas muy concretas, fueron los anticuerpos contra las proteínas paranodales CNTN1 y NF155. Estos autoanticuerpos, cuya capacidad patogénica ha sido demostrada en modelos animales, han sido validados por otros grupos y su detección tiene relevancia clínica en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos pacientes. Más recientemente, otros autoanticuerpos dirigidos contra moléculas de adhesión del NdR (CASPR1 y NF140/NF186) se han descrito en grupos reducidos de pacientes. Sin embargo, su correlación clínico-inmunológica aún debe ser dilucidada. El objetivo principal de nuestro estudio fue identificar autoanticuerpos potenciales contra los principales componentes del nervio periférico en los pacientes con CIDP mediante técnicas de cribado sistemático. Adicionalmente también buscamos testar



la reactividad de estos pacientes contra antígenos previamente descritos para esta enfermedad.

Sesenta y cinco pacientes con CIDP según los criterios diagnósticos EFNS/PNS y 28 controles sanos fueron incluidos en el estudio. Los sueros de los pacientes se analizaron por ensayo de inmunoabsorción asociado a enzima (ELISA) para detectar anticuerpos anti-gangliósidos y por inmunocitoquímica para detectar anticuerpos contra antígenos previamente descritos de la mielina (MPZ, PMP2) o el NdR (CNTN1, NF155, NrCAM, GMD, los complejos CNTN1/CASPR1 y CNTN2/CASPR2 y las subunidades NavB1 y NavB2 del principal canal de sodio del NdR). Sólo los pacientes que no presentaron reactividad contra estos antígenos (n=57) y los controles negativos (n=28) se incluyeron en los experimentos de cribado de autoanticuerpos. El cribado de nuevos antígenos en los principales componentes del nervio periférico, se llevó a cabo mediante inmunocitoquímica en neuronas de GRD y neuronas motoras obtenidas de cultivos primarios de rata, y en una línea comercial de células de Schwann humanas desdiferenciadas. Los pacientes que presentaron reactividad, de tipo IgG o IgM, contra alguna de estas células fueron inmunoprecipitados para intentar identificar el antígeno diana. Adicionalmente, una muestra obtenida a partir de la unificación del suero de cinco pacientes con CIDP típica, fue inmunoprecipitada sobre lisado de nervio ciático de rata y sobre cauda equina humana. El rol antigénico de cualquier proteína identificada en estos experimentos por espectrometría de masas, fue posteriormente evaluado mediante inmunocitoquímica sobre células embrionarias de riñón humano (HEK) transfectadas con las secuencias de ADN codificantes para la proteína de interés.

Once pacientes (11/59; 18.6%) mostraron reactividad anti-gangliósidos, cuatro de ellos (6.7%) con títulos elevados de anticuerpos IgM anti-GM1. Tres de estos pacientes presentaron conducciones sensitivas normales a pesar de su severa afectación sensitiva, sugiriendo un daño preganglionar. El cuarto paciente mostró una afectación sensitivo-motora en el EMG. Dos de los pacientes con anticuerpos anti-GM1, presentaron reactividad adicional de tipo IgM contra GD1b, con o sin otras reactividades asociadas. Ambos pacientes presentaron la variante CIDP de Lewis-Sumner, aunque más adelante en el curso de la enfermedad progresaron hacia una polineuropatía simétrica bilateral. Los otros dos pacientes con anticuerpos anti-GM1 presentaron la variante típica de CIDP.

Cuatro pacientes reaccionaron contra CNTN1 (4/65, 6.2%), uno contra el complejo CNTN1 / CASPR1 (1/65, 1.5%) y tres contra NF155 (3/65, 4.6%). Todos ellos, excepto dos (uno CNTN1 y uno NF155 positivo), han sido reportados previamente por nuestro grupo. Un paciente (1/62, 1.6%) con un fenotipo típico de CIDP reaccionó contra PMP2, marcaje que fue corroborado en LCR. Ninguno de los demás pacientes reaccionó contra los otros antígenos candidatos testados.

Un número significativo de pacientes (22/57; 38.6%) mostraron algún tipo de reactividad contra alguno de los tres tipos celulares testados, siendo ésta extensiva a varios tipos celulares en algunos de los pacientes. Nueve pacientes presentaron una reactividad moderada o intensa de tipo IgG o IgM contra las neuronas de GRD o las células de Schwann. Seis de estos pacientes fueron incluidos en los experimentos de inmunoprecipitación realizados utilizando estas células como sustrato. La comparación estadística entre las reactividades apreciadas en los pacientes y los controles del estudio no evidenció diferencias significativas entre ambos grupos. Adicionalmente no se identificó ningún antígeno relevante en el análisis por espectrometría de masas de las muestras inmunoprecipitadas.

Los experimentos de inmunoprecipitación sobre extracto de nervio ciático de rata y cauda equina humana en pacientes con CIDP típica identificaron como posibles candidatos las proteínas L1CAM, una CAM de la familia de neurofascina, y CD9, una proteína de la familia de las tetraspaninas presente en el paranodo de Ranvier. Sin embargo, tras evaluar su potencial antigénico mediante inmunocitoquímica sobre células HEK transfectadas su rol como posibles antígenos en CIDP no fue confirmado.

---

### 5.1.2 RELEVANCIA

Nuestro estudio representa el mayor cribado de autoantígenos realizado hasta la fecha en la CIDP y se caracteriza por ser el primer estudio que utiliza los principales componentes neuronales del nervio periférico, las neuronas de GRD y las neuronas motoras, en la búsqueda de nuevas reactividades antigénicas en esta enfermedad.

Aunque los experimentos de inmunoprecipitación no han permitido la identificación de nuevos antígenos, nuestro estudio evidencia la heterogeneidad fenotípica de esta enfermedad y contribuye en la noción de que estos pacientes presentan un perfil de

reactividad inmunológica muy diverso hacia las principales células que conforman el nervio periférico. Estos resultados sugieren que múltiples antígenos aún por descubrir, podrían ser los responsables de la respuesta inmunopatológica de los pacientes con CIDP y abren nuevas vías de trabajo para la identificación de potenciales antígenos en esta enfermedad. Asimismo, de forma indirecta, nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de fomentar la difusión de registros estandarizados que permitan la interconectividad de datos y que contribuyan a la buena caracterización clínica de los pacientes de CIDP, hecho que podría facilitar la selección de cohortes más homogéneas en futuros estudios de cribado de autoanticuerpos.

### 5.2 ARTÍCULO II

#### 5.2.1 SÍNTESIS DE RESULTADOS

Las neuropatías paraneoplásicas son trastornos raros y heterogéneos del nervio periférico que se desarrollan en el contexto de un cáncer. Aunque su inmunopatogenia es desconocida, se cree que éstas se desarrollan como consecuencia de un ataque autoinmune ocasionado por la expresión ectópica de antígenos neurales por parte de un tumor, hecho que conlleva a la producción de los denominados anticuerpos onconeuronales o paraneoplásicos. La detección de dichos anticuerpos en el suero y el LCR de estos pacientes, sugiere un papel fundamental de la inmunidad humoral en la inmunopatogenia de estas enfermedades. A su vez, la identificación de estos autoanticuerpos puede presentar una gran relevancia clínica, ya que además de guiar lo que a menudo es un diagnóstico complejo, éstos pueden contribuir en la detección de un cáncer subyacente. Salvo los anticuerpos anti-Hu y anti-CV2/CRMP5, la mayoría de anticuerpos onconeuronales bien caracterizados descritos hasta la fecha se asocian con trastornos del SNC. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de caracterizar reactividades antigénicas potenciales en estas afecciones del SNP.

Con el estudio llevado a cabo, buscamos identificar autoanticuerpos potenciales contra los principales componentes del nervio periférico en los pacientes con neuropatías paraneoplásicas mediante técnicas de cribado sistemático. Adicionalmente, dada la contribución en la patogénesis del cáncer reportada para CNTN1 y para otras CAMs, también buscamos testar la reactividad de estos pacientes contra moléculas de adhesión celular neurales para evaluar su posible papel como antígenos en estas enfermedades.

Treinta y cuatro pacientes con diagnóstico de neuropatía paraneoplásica posible (n=9) o definida (n=25) según los criterios diagnósticos recomendados para estos síndromes y 28 controles sanos fueron incluidos en el estudio. Los sueros de los pacientes se testaron por inmunocitoquímica para detectar anticuerpos contra L1CAM y NCAM1 y contra otras moléculas de adhesión situadas en el NdR (CNTN1, NF140, NF155, NF186, CASPR2 y el complejo CNTN1/CASPR1). El cribado de nuevos antígenos en los principales componentes del nervio periférico, se llevó a cabo mediante inmunocitoquímica en neuronas de GRD, neuronas motoras y células de Schwann obtenidas de cultivos primarios de rata. Los pacientes que presentaron reactividad, de tipo IgG o IgM, contra alguna de estas células fueron inmunoprecipitados para intentar identificar el antígeno diana. El rol antigénico de cualquier proteína identificada en estos experimentos por espectrometría de masas, fue posteriormente evaluado mediante inmunocitoquímica sobre células embrionarias de riñón humano (HEK) transfectadas con secuencias de ADN codificantes para la proteína de interés.

En nuestro estudio, nueve pacientes (26.5%) reaccionaron de forma intensa o moderada contra neuronas de GRD, neuronas motoras o células de Schwann. Sin embargo, al comparar las frecuencias observadas de estos marcajes en todos los pacientes y en los controles sanos, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Al estratificar por fenotipo, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la cohorte de pacientes con neuropatía sensitivo-motora. Estos pacientes presentaron un marcaje de tipo IgM contra las células de Schwann con mayor frecuencia que los controles sanos ( $p=0.0028$ ) y que los pacientes con neuronopatía sensitiva pura ( $p=0.0190$ ). De los diez pacientes con neuropatía sensitivo-motora, cuatro presentaron un marcaje intenso o moderado de tipo IgM contra las células de Schwann, todos ellos con un debut agresivo, tres de ellos con un patrón axonal en el EMG. Dos de estos pacientes fueron inmunoprecipitados para identificar el antígeno responsable de esta respuesta. Desafortunadamente ningún antígeno candidato fue identificado por espectrometría de masas en nuestros experimentos. Tampoco se pudieron establecer correlaciones clínico-inmunológicas claras entre los pacientes que presentaron este marcaje. Dos de los pacientes con neuronopatía sensitiva presentaron una reactividad moderada de tipo IgG contra las neuronas de DRG de cultivo primario de rata. El suero de ambos pacientes se inmunoprecipitó, junto con una muestra control, utilizando estas células como sustrato. Sin

embargo, ningún antígeno candidato fue identificado como resultado de estos experimentos.

El estudio llevado a cabo no permitió la identificación de ningún paciente que reaccionase contra CNTN1, NF155, NF140, NF186, NCAM1, L1CAM o el complejo CNTN1 / CASPR1. Sólo uno de nuestros pacientes reaccionó contra CASPR2. Dicho paciente presentaba un timoma y una polirradiculoneuropatía sensitivo-motora crónica de progresión rápida con características desmielinizantes en el EMG, cumpliendo los criterios diagnósticos de CIDP. Este paciente no mostró ninguna evidencia de neuromiotonía (frecuentemente asociada con anticuerpos anti-CASPR2 y timoma) o de afectación del SNC.

---

### 5.2.2 RELEVANCIA

Nuestro estudio representa una aproximación novedosa en el cribado de nuevas reactividades antigénicas de superficie en las neuropatías paraneoplásicas y aporta evidencia experimental del perfil heterogéneo de reactividad de tipo IgG e IgM en los pacientes con estas enfermedades.

Aunque los experimentos de inmunoprecipitación no han permitido la identificación de nuevos antígenos, probablemente por la diversidad inmunopatológica y por el número reducido de pacientes en nuestra cohorte, nuestro estudio evidencia que casi un 30% de los pacientes estudiados reaccionan de forma intensa o moderada contra los principales tipos celulares que componen el nervio periférico. Estos resultados ponen de manifiesto la heterogeneidad fenotípica inherente en estas enfermedades y contribuye en la noción de que estos pacientes presentan un perfil de reactividad inmunológica muy diverso. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que existen antígenos aún por descubrir en las neuropatías paraneoplásicas.





## 6. CONCLUSIONES

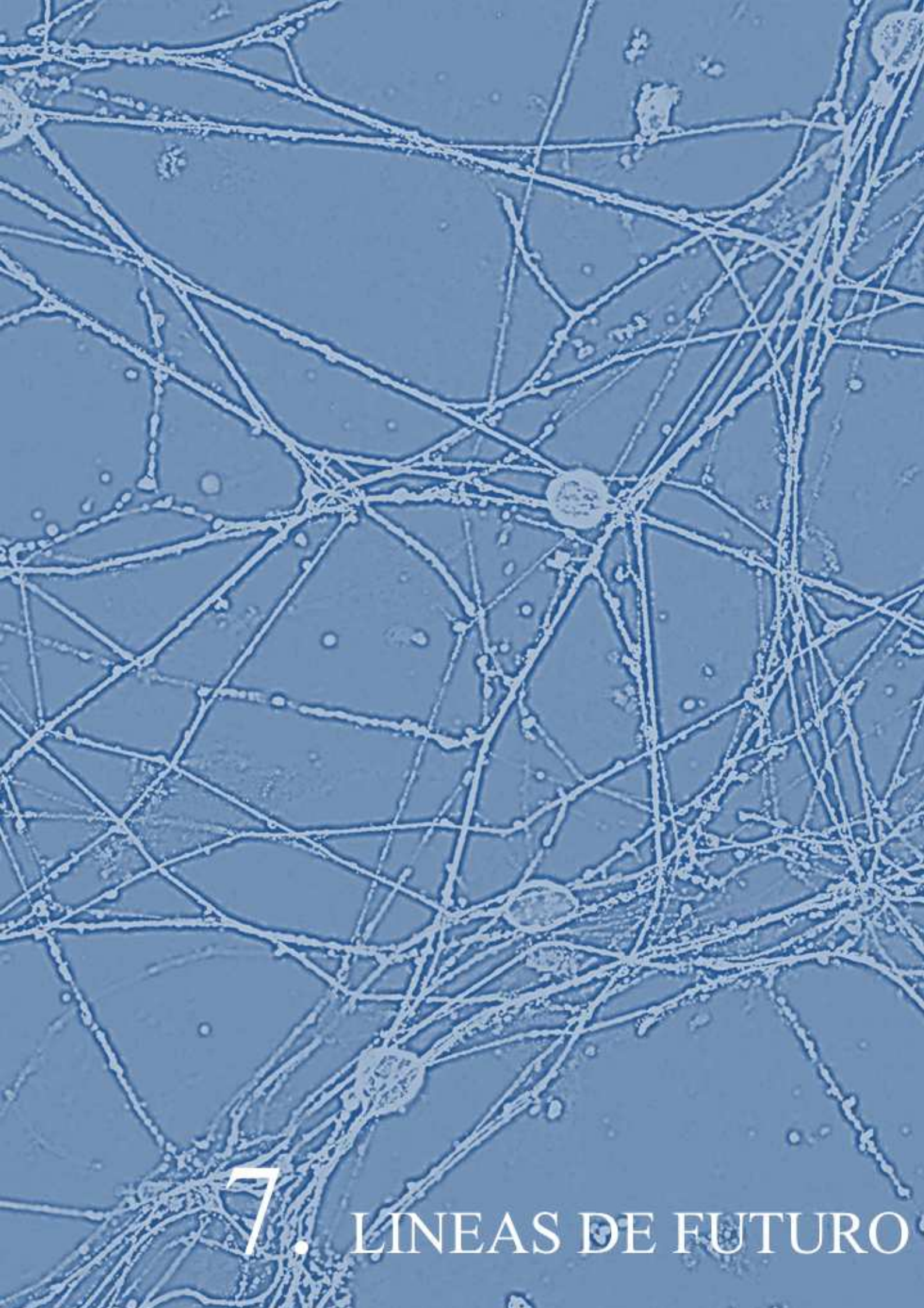


### CONCLUSIONES

- La CIDP y las neuropatías paraneoplásicas son neuropatías inmunomediadas ampliamente heterogéneas en las que los pacientes presentan múltiples reactividades de tipo IgG e IgM contra los principales tipos celulares del nervio periférico.
- Los marcajes observados en los pacientes con CIDP y neuropatías paraneoplásicas sugieren que existen antígenos aún por descubrir en estas enfermedades.
- El estudio de cohortes amplias y bien caracterizadas, así como la superación de determinadas limitaciones técnicas, podría auspiciar la identificación de nuevos antígenos en futuros estudios de cribado de autoanticuerpos.







# 7. LINEAS DE FUTURO





## LINEAS DE FUTURO

Los estudios de cribado realizados en el transcurso de esta tesis ponen de manifiesto que los pacientes con CIDP y con neuropatías paraneoplásicas presentan múltiples reactividades de tipo IgG e IgM contra los principales tipos celulares del nervio periférico.

En futuros estudios, nuestros esfuerzos se centrarán en tratar de identificar los posibles antígenos responsables de las reactividades observadas en estos pacientes mediante nuevas técnicas experimentales.

A tal fin utilizaremos aproximaciones que nos permitan salvar las limitaciones que hemos observado en el transcurso de nuestros experimentos, tales como el uso de células de origen humano para los experimentos de cribado o el análisis de glúcidos como posibles candidatos a antígenos.





## 8. BIBLIOGRAFÍA





## BIBLIOGRAFÍA

1. Rohkamm R. *Neurología. Texto y Atlas*. Ed. Médica Panamericana, 2011.
2. Bilbao JM, Schmidt RE. *Biopsy Diagnosis of Peripheral Neuropathy*. Springer International Publishing, 2015.
3. Rigoard P. *Atlas of Anatomy of the Peripheral Nerves*. Springer International Publishing, 2017.
4. Manzano GM, Giuliano LMP, Nóbrega JAM. A brief historical note on the classification of nerve fibers. *Arq Neuropsiquiatr* 2008; 66: 117–9.
5. Marani E, Lakke E. Peripheral Nervous System Topics. In: *The human Nervous System*. Elsevier Inc., 2012.
6. Bunge MB, Bunge RP, Pappas GD. Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 1962; 12: 448–53.
7. Ben Geren B. The formation from the Schwann cell surface of myelin in the peripheral nerves of chick embryos. *Exp Cell Res* 1954; 7: 558–62.
8. Herbert AL, Monk KR. Advances in myelinating glial cell development. *Curr Opin Neurobiol* 2017; 42: 53–60.
9. Nave K. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 275–283.
10. Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 683–90.
11. Susuki K. Node of Ranvier Disruption as a Cause of Neurological Diseases. *ASN Neuro* 2013; 5: AN20130025.
12. Nelson AD, Jenkins PM. Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 1–17.
13. Susuki K, Otani Y, Rasband MN. Submembranous cytoskeletons stabilize nodes of Ranvier. *Exp Neurol* 2016; 283: 446–451.
14. Carroll SL. The Molecular and Morphologic Structures That Make Saltatory Conduction Possible in Peripheral Nerve. *J Neuropathol Exp Neurol* 2017; 76: 255–257.
15. Eshed-Eisenbach Y, Peles E. The making of a node: a co-production of neurons and

- glia. *Curr Opin Neurobiol* 2013; 23: 1049–56.
16. Rasband MN, Peles E. The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 8: a020495.
  17. Querol L, Devaux J, Rojas-Garcia R, et al. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Neurol* 2017; 13: 533–547.
  18. Faivre-Sarrailh C, Devaux JJ. Neuro-glial interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 1–13.
  19. Normand EA, Rasband MN. Subcellular patterning: Axonal domains with specialized structure and function. *Dev Cell* 2015; 32: 459–468.
  20. Buttermore ED, Thaxton CL, Bhat MA. Organization and maintenance of molecular domains in myelinated axons. *J Neurosci Res* 2013; 91: 603–22.
  21. Simpson AH, Gillingwater TH, Anderson H, et al. Effect of limb lengthening on internodal length and conduction velocity of peripheral nerve. *J Neurosci* 2013; 33: 4536–9.
  22. Duméniou M, Oulé M, Kreutz MR, et al. The Segregated Expression of Voltage-Gated Potassium and Sodium Channels in Neuronal Membranes: Functional Implications and Regulatory Mechanisms. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 1–19.
  23. Uncini A, Susuki K, Yuki N. Nodoparaneuropathy: Beyond the demyelinating and axonal classification in anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Clin Neurophysiol* 2013; 124: 1928–1934.
  24. Fehmi J, Scherer SS, Willison HJ, et al. Nodes, paranodes and neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018; 89: 61–71.
  25. Weerasuriya A, Mizisin AP. The Blood-Nerve Barrier: Structure and Functional Significance. In: *The Blood-Brain and Other Neural Barriers*. Humana Press, 2011.
  26. Reinhold A, Rittner H. Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2017; 469: 123–134.
  27. Greathouse KM, Palladino SP, Dong C, et al. Modeling leukocyte trafficking at the human blood-nerve barrier in vitro and in vivo geared towards targeted molecular therapies for peripheral neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2016; 13: 1–11.
  28. Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84: 208–212.
  29. Wessig C. Detection of Blood–Nerve Barrier Permeability by Magnetic Resonance

- Imaging. In: *The Blood-Brain and Other Neural Barriers*. Humana Press, 2011.
30. Spies JM, Westland KW, Bonner JG, et al. Intra-neural activated T cells cause focal breakdown of the blood-nerve barrier. *Brain* 1995; 118: 857–868.
  31. Kieseier BC, Hartung HP, Wiendl H. Immune circuitry in the peripheral nervous system. *Curr Opin Neurol* 2006; 19: 437–445.
  32. Gold R, Archelos JJ, Hartung HP. Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system. *Brain Pathol* 1999; 9: 343–360.
  33. Hughes R. Immune responses in the peripheral nervous system. *Semin Neurosci* 1992; 4: 257–263.
  34. Zettl UK, Gold R, Toyka KV, et al. Intravenous Glucocorticosteroid Treatment Augments Apoptosis of Inflammatory T Cells in Experimental Autoimmune Neuritis (EAN) of the Lewis Rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 540–547.
  35. Harvey GK, Pollard JD, Schindhelm K, et al. Experimental allergic: effect of plasma infusions. *Clin exp Immunol* 1989; 76: 452–457.
  36. Lin HH, Spies JM, Lu JL, et al. Effective treatment of experimental autoimmune neuritis with human immunoglobulin. *J Neurol Sci* 2007; 256: 61–67.
  37. Griffin JW, Li CY, Ho TW, et al. Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1996; 39: 17–28.
  38. Birnbaum G, Antel J, Hartung H-P. Introduction to immunology. In: *Clinical Immunology*. Oxford University Press, 2005.
  39. Gold R, Kieseier BC, Hartung H-P. Immunological properties of the peripheral nervous system. In: *Clinical Immunology*. Oxford University Press, 2005.
  40. Muller WA. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2011; 6: 323–344.
  41. Zhang ZM, Shi R, Chen H, et al. Lesional accumulation of CD8+ cells in sciatic nerves of experimental autoimmune neuritis rats. *Neurol Sci* 2016; 37: 199–203.
  42. Klein D, Martini R. Myelin and macrophages in the PNS: An intimate relationship in trauma and disease. *Brain Res* 2016; 1641: 130–138.
  43. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 2015; 42: 607–12.
  44. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity* 2013; 38: 414–423.
  45. Chi L, Wang H-B, Wang W. Impairment of circulating CD4+CD25+ regulatory T

- cells in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2008; 13: 54–63.
46. Harness J, McCombe PA. Increased levels of activated T-cells and reduced levels of CD4/CD25+ cells in peripheral blood of Guillain-Barré syndrome patients compared to controls. *J Clin Neurosci* 2008; 15: 1031–1035.
  47. Schafflick D, Kieseier BC, Wiendl H, et al. Novel pathomechanisms in inflammatory neuropathies. *J Neuroinflammation* 2017; 14: 1–17.
  48. Bai XF, Zhu J, Zhang GX, et al. IL-10 suppresses experimental autoimmune neuritis and down-regulates T(H)1-type immune responses. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83: 117–126.
  49. Meyer Zu Hörste G, Cordes S, Mausberg AK, et al. FoxP3+ regulatory T cells determine disease severity in rodent models of inflammatory neuropathies. *PLoS One* 2014; 9: 1–9.
  50. Ubogu EE. Inflammatory neuropathies: pathology, molecular markers and targets for specific therapeutic intervention. *Acta Neuropathol* 2015; 130: 445–468.
  51. Dalakas MC. Pathogenesis of immune-mediated neuropathies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2015; 1852: 658–666.
  52. Kanda T, Yamawaki M, Mizusawa H. Sera from Guillain-Barré patients enhance leakage in blood-nerve barrier model. *Neurology* 2003; 60: 301–306.
  53. Sanvito L, Makowska A, Mahdi-Rogers M, et al. Humoral and cellular immune responses to myelin protein peptides in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80: 333–8.
  54. Manso C, Querol L, Mekaouche M, et al. Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects. *Brain* 2016; 139: 1700–12.
  55. Manso C, Querol L, Mekaouche M, et al. Anti-NFASC155 IgG4 affect paranode structure in animal models. In: *Peripheral Nerve Society Meeting Abstracts*. 2017.
  56. Darnell R, Posner J. Paraneoplastic Syndromes Involving the Nervous System. *N Engl J Med* 2003; 349: 1543–54.
  57. Giometto B, Grisold W, Vitaliani R, et al. Paraneoplastic neurologic syndrome in the PNS Euronetwork database: a European study from 20 centers. *Arch Neurol* 2010; 67: 330–335.
  58. Kieseier, Bernd C; Hartung H-P. Guillain-Barré Syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. In: *Clinical Immunology*. Oxford University

- Press, 2005.
59. Hughes RA, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 2005; 366: 1653–1666.
  60. Rink C, Görtzen A, Veh RW, et al. Serum antibodies targeting neurons of the monoaminergic systems in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Sci* 2017; 372: 318–323.
  61. Da Silva IRF, Frontera JA, De Filippis AMB, et al. Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. *JAMA Neurol* 2017; 74: 1190–1198.
  62. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet (London, England)* 2016; 387: 1531–1539.
  63. Lucchese G, Kanduc D. Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. *Autoimmun Rev* 2016; 15: 801–808.
  64. Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Pract Neurol* 2008; 4: 557–567.
  65. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic Syndromes Affecting the Nervous System. *Semin Oncol* 2006; 33: 270–298.
  66. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1135–1140.
  67. Vedeler CA, Antoine JC, Giometto B, et al. Management of paraneoplastic neurological syndromes: Report of an EFNS Task Force. *Eur J Neurol* 2006; 13: 682–690.
  68. Graus F, Dalmau J. Paraneoplastic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2013; 26: 489–495.
  69. Didelot A, Honnorat J. Paraneoplastic disorders of the central and peripheral nervous systems. *Handb Clin Neurol* 2014; 121: 1156–1179.
  70. Muppidi S, Vernino S. Paraneoplastic neuropathies. *Continuum (Minneapolis)* 2014; 20: 1359–72.
  71. Duddy M, Niino M, Adatia F, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007; 178: 6092–9.



72. Guptill JT, Yi JS, Sanders DB, et al. Characterization of B cells in muscle-specific kinase antibody myasthenia gravis. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation* 2015; 2: e77.
73. Quan C, Yu H, Qiao J, et al. Impaired regulatory function and enhanced intrathecal activation of B cells in neuromyelitis optica: distinct from multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19: 289–98.
74. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; 3: 944–50.
75. Kaufman GN, Massoud AH, Dembele M, et al. Induction of Regulatory T Cells by Intravenous Immunoglobulin: A Bridge between Adaptive and Innate Immunity. *Front Immunol* 2015; 6: 469.
76. Maddur MS, Rabin M, Hegde P, et al. Intravenous immunoglobulin exerts reciprocal regulation of Th1/Th17 cells and regulatory T cells in Guillain-Barré syndrome patients. *Immunol Res* 2014; 60: 320–9.
77. Kabuto M, Fujimoto N, Tanaka T. Increase of interleukin-10-producing B cells associated with long-term remission after i.v. immunoglobulin treatment for pemphigus. *J Dermatol* 2016; 43: 815–818.
78. Siles AM, Assylbekova D, Diaz-Manera J, et al. Regulatory B cell frequencies increase after IVIg therapy in inflammatory neuropathies. In: *Peripheral Nerve Society Meeting Abstracts*. 2017.
79. Beirowski B, Babetto E, Golden JP, et al. Metabolic regulator LKB1 is crucial for Schwann cell-mediated axon maintenance. *Nat Neurosci* 2014; 17: 1351–1361.
80. Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol* 2016; 594: 3521–3531.
81. Hörste GMZ, Hu W, Hartung HP, et al. The immunocompetence of Schwann cells. *Muscle and Nerve* 2008; 37: 3–13.
82. Medzhitov R, Janeway C. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338–344.
83. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373–384.
84. Joosten LAB, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, et al. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol* 2016; 12: 344–357.
85. Ydens E, Lornet G, Smits V, et al. The neuroinflammatory role of Schwann cells in

- disease. *Neurobiol Dis* 2013; 55: 95–103.
86. Hao HN, Peduzzi-Nelson JD, VandeVord PJ, et al. Lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production by Schwann's cells dependent upon TLR4 expression. *J Neuroimmunol* 2009; 212: 26–34.
87. Lee H, Park C, Cho I-H, et al. Double-stranded RNA induces iNOS gene expression in Schwann cells, sensory neuronal death, and peripheral nerve demyelination. *Glia* 2007; 55: 712–722.
88. Laurà M, Mazzeo A, Aguenouz M, et al. Immunolocalization and activation of nuclear factor- $\kappa$ B in the sciatic nerves of rats with experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* 2006; 174: 32–38.
89. Varela JC, Tomlinson S. Complement. An Overview for the Clinician. *Hematol Oncol Clin North Am* 2015; 29: 409–427.
90. Stoll G, Schmidt B, Jander S, et al. Presence of the terminal complement complex (C5b-9) precedes myelin degradation in immune-mediated demyelination of the rat peripheral nervous system. *Ann Neurol* 1991; 30: 147–155.
91. Halstead SK, Humphreys PD, Zitman FMP, et al. C5 inhibitor rEV576 protects against neural injury in an in vitro mouse model of Miller Fisher syndrome. *J Peripher Nerv Syst* 2008; 13: 228–235.
92. Putzu GA, Figarella-Branger D, Bouvier-Labit C, et al. Immunohistochemical localization of cytokines, C5b-9 and ICAM-1 in peripheral nerve of Guillain-Barre Syndrome. *J Neurol Sci* 2000; 174: 16–21.
93. Dashiell SM, Vanguri P, Koski CL. Dibutyryl cyclic AMP and inflammatory cytokines mediate C3 expression in schwann cells. *Glia* 1997; 20: 308–321.
94. De Jonge RR, Vreijling JP, Meintjes A, et al. Transcriptional profile of the human peripheral nervous system by serial analysis of gene expression. *Genomics* 2003; 82: 97–108.
95. Vedeler CA, Conti G, Fujioka T, et al. The expression of CD59 in experimental allergic neuritis. *J Neurol Sci* 1999; 165: 154–159.
96. Vedeler CA, Matre R. Peripheral nerve CR1 limit complement-mediated haemolysis. *J Neuroimmunol* 1990; 30: 95–98.
97. Koski CL, Estep AE, Sawant-Mane S, et al. Complement regulatory molecules on human myelin and glial cells: differential expression affects the deposition of activated complement proteins. *J Neurochem* 1996; 66: 303–12.

98. Kingston AE, Bergsteinsdottir K, Jessen KR, et al. Schwann cells co-cultured with stimulated T cells and antigen express major histocompatibility complex (MHC) class II determinants without interferon-gamma pretreatment: synergistic effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor on MHC class II ind. *Eur J Immunol* 1989; 19: 177–183.
99. Lilje O, Armati PJ. The distribution and abundance of MHC and ICAM-1 on Schwann cells in vitro. *J Neuroimmunol* 1997; 77: 75–84.
100. Pollard JD, McCombe PA, Baverstock J, et al. Class II antigen expression and T lymphocyte subsets in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 1986; 13: 123–134.
101. Pollard JD, Baverstock J, McLeod JG. Class II antigen expression and inflammatory cells in the Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1987; 21: 337–341.
102. Murata K, Dalakas MC. Expression of the co-stimulatory molecule BB-1, the ligands CTLA-4 and CD28 and their mRNAs in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 2000; 123 ( Pt 8: 1660–6.
103. Kiefer R, Dangond F, Mueller M, et al. Enhanced B7 costimulatory molecule expression in inflammatory human sural nerve biopsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69: 362–368.
104. Mao XJ, Zhang XM, Zhang HL, et al. TNF- $\alpha$  receptor 1 deficiency reduces antigen-presenting capacity of Schwann cells and ameliorates experimental autoimmune neuritis in mice. *Neurosci Lett* 2010; 470: 19–23.
105. Tzekova N, Heinen A, Küry P. Molecules involved in the crosstalk between immune- and peripheral nerve Schwann cells. *J Clin Immunol* 2014; 34: 86–104.
106. Constantin G, Piccio L, Bussini S, et al. Induction of adhesion molecules on human Schwann cells by proinflammatory cytokines, an immunorescence study. *J Neurol Sci* 1999; 170: 124–130.
107. Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, et al. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 2002; 22: 6696–6703.
108. Orlikowski D, Chazaud B, Plonquet A, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 and chemokine receptor CCR2 syndrome and experimental productions in Guillain-Barre autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* 2003; 134: 118–127.

109. Constable AL, Armati PJ, Toyka K V., et al. Production of prostanoids by Lewis rat Schwann cells in vitro. *Brain Res* 1994; 635: 75–80.
110. Constable AL, Armati PJ, Hartung HP. DMSO induction of the leukotriene LTC<sub>4</sub> by Lewis rat Schwann cells. *J Neurol Sci* 1999; 162: 120–126.
111. Wohlleben G, Ibrahim SM, Schmidt J, et al. Regulation of Fas and FasL expression on rat Schwann cells. *Glia* 2000; 30: 373–381.
112. Bonetti B, Valdo P, Ossi G, et al. T-cell cytotoxicity of human Schwann cells: TNF $\alpha$  promotes fasL-mediated apoptosis and IFN gamma perforin-mediated lysis. *Glia* 2003; 43: 141–8.
113. Weishaupt A, Brück W, Hartung T, et al. Schwann cell apoptosis in experimental autoimmune neuritis of the Lewis rat and the functional role of tumor necrosis factor-alpha. *Neurosci Lett* 2001; 306: 77–80.
114. Gold R, Zielasek J, Kiefer R, et al. Secretion of nitrite by Schwann cells and its effect on T-cell activation in vitro. *Cell Immunol* 1996; 168: 69–77.
115. Keswani SC, Bosch-Marce M, Reed N, et al. Nitric oxide prevents axonal degeneration by inducing HIF-1-dependent expression of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 4986–4990.
116. Ahn M, Moon C, Jeong C, et al. Upregulation of erythropoietin in rat peripheral nervous system with experimental autoimmune neuritis. *Brain Res* 2010; 1333: 82–90.
117. Luo B, Jiang M, Yang X, et al. Erythropoietin is a hypoxia inducible factor-induced protective molecule in experimental autoimmune neuritis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 1260–70.
118. Ozaki A, Nagai A, Lee YB, et al. Expression of cytokines and cytokine receptors in human Schwann cells. *Neuroreport* 2008; 19: 31–5.
119. Zhu J, Bai XF, Mix E, et al. Cytokine dichotomy in peripheral nervous system influences the outcome of experimental allergic neuritis: Dynamics of mRNA expression for IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , and cytolysin. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84: 85–94.
120. Andorfer B, Kieseier BC, Mathey E, et al. Expression and distribution of transcription factor NF-kappaB and inhibitor IkappaB in the inflamed peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 2001; 116: 226–232.
121. Joshi AR, Holtmann L, Bobylev I, et al. Loss of Schwann cell plasticity in chronic

- inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *J Neuroinflammation* 2016; 13: 1–9.
122. Bourque PR, Chardon JW, Massie R. Autoimmune peripheral neuropathies. *Clin Chim Acta* 2015; 449: 37–42.
123. Meyer zu Hörste G, Hartung H-P, Kieseier BC. From bench to bedside—experimental rationale for immune-specific therapies in the inflamed peripheral nerve. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3: 198–211.
124. Lewis RA. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Curr Opin Neurol* 2017; 30: 508–512.
125. Dalakas MC. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 507–517.
126. Lunn MP, Manji H, Choudhary PP, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a prevalence study in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 677–80.
127. Querol L, Rojas-Garcia R, Casanovas C, et al. Long-term outcome in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients treated with intravenous immunoglobulin: A retrospective study. *Muscle Nerve* 2013; 48: 870–876.
128. Rotta FT, Sussman AT, Bradley WG, et al. The spectrum of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Sci* 2000; 173: 129–139.
129. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, et al. Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 2013; 73: 370–80.
130. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, et al. Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology* 2014; 82: 879–86.
131. Doppler K, Appeltshauer L, Villmann C, et al. Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain* 2016; 139: 2617–2630.
132. Delmont E, Manso C, Querol L, et al. Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 2017; 140: 1851–1858.
133. Ruts L, Van Koningsveld R, Van Doorn PA. Distinguishing acute-onset CIDP from Guillain–Barré syndrome with treatment related fluctuations. *Neurology* 2005; 65: 138–140.



134. Van den Bergh PYK, Hadden RDM, Bouche P, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripher. *Eur J Neurol* 2010; 17: 356–363.
135. Brannagan TH. Current diagnosis of CIDP: the need for biomarkers. *J Peripher Nerv Syst* 2011; 16 Suppl 1: 3–13.
136. Hughes RAC, Bouche P, Cornblath DR, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripher. *Eur J Neurol* 2006; 13: 326–332.
137. Querol L, Rojas-Garcia R, Diaz-Manera J, et al. Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2015; 2 (5): e149.
138. Allen JA, Lewis RA. CIDP diagnostic pitfalls and perception of treatment benefit. *Neurology* 2015; 85: 498–504.
139. Bromberg MB. Review of the evolution of electrodiagnostic criteria for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle and Nerve* 2011; 43: 780–794.
140. Illa I. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: clinical aspects and new animal models of auto-immunity to nodal components. *J Peripher Nerv Syst* 2017; 22: 418–424.
141. Eftimov F, Winer JB, Vermeulen M, et al. Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane database Syst Rev* 2013; 12: CD001797.
142. Hughes RA, Mehndiratta MM, Rajabally YA. Corticosteroids for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane database Syst Rev* 2017; 11: CD002062.
143. Mehndiratta MM, Hughes RAC, Pritchard J. Plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane database Syst Rev* 2015; CD003906.
144. Mahdi-Rogers M, Brassington R, Gunn AA, et al. Immunomodulatory treatment

- other than corticosteroids, immunoglobulin and plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane database Syst Rev* 2017; 5: CD003280.
145. Joly P, Mouquet H, Roujeau J-C, et al. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *N Engl J Med* 2007; 357: 545–52.
  146. Díaz-Manera J, Martínez-Hernández E, Querol L, et al. Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology* 2012; 78: 189–93.
  147. DeAngelis LM, Posner JB. *Neurologic Complications of Cancer*. Oxford University Press, 2008.
  148. Bataller L, Graus F. Síndromes Neurológicas Paraneoplásicas. In: *Tratado de Neurología*. Ars Medica, 2008.
  149. Rauer S, Andreou I. Tumor progression and serum anti-HuD antibody concentration in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *Eur Neurol* 2002; 47: 189–195.
  150. Maddison P, Newsom-Davis J, Mills K, et al. Favourable prognosis in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and small-cell lung carcinoma. *Lancet* 1999; 353: 117–118.
  151. Zoccarato M, Gastaldi M, Zuliani L, et al. Diagnostics of paraneoplastic neurological syndromes. *Neurol Sci* 2017; 38: 237–242.
  152. Graus F, Dalmau J. Paraneoplastic neurological syndromes. *Curr Opin Neurol* 2012; 25: 795–801.
  153. Lancaster E. Paraneoplastic Disorders. *Continuum (Minneapolis)* 2017; 23: 1653–1679.
  154. Bataller L, Wade DF, Graus F, et al. Antibodies to Zic4 in paraneoplastic neurological disorders and small-cell lung cancer. *Neurology* 2004; 62: 778–782.
  155. Drlicek M, Bianchi G, Bogliun G, et al. Antibodies of the anti-Yo and anti-Ri type in the absence of paraneoplastic neurological syndromes: A long-term survey of ovarian cancer patients. *J Neurol* 1997; 244: 85–89.
  156. Graus F, Keime-Guibert F, Reñe R, et al. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 2001; 124: 1138–1148.
  157. Koike H, Sobue G. Paraneoplastic neuropathy. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., 2013.
  158. Kuntzer T, Antoine JC, Steck AJ. Clinical features and pathophysiological basis of

- sensory neuropathies (ganglionopathies). *Muscle and Nerve* 2004; 30: 255–268.
159. Camdessanché JP, Jousserand G, Ferraud K, et al. The pattern and diagnostic criteria of sensory neuropathy: a case-control study. *Brain* 2009; 132: 1723–1733.
160. Dalmau J, Verschuuren J. Paraneoplastic syndromes. In: *Clinical Immunology*. Oxford University Press, 2005.
161. Camdessanché J-P, Antoine J-C, Honnorat J, et al. Paraneoplastic peripheral neuropathy associated with anti-Hu antibodies. A clinical and electrophysiological study of 20 patients. *Brain* 2002; 125: 166–175.
162. Honnorat J, Cartalat-Carel S, Ricard D, et al. Onco-neural antibodies and tumour type determine survival and neurological symptoms in paraneoplastic neurological syndromes with Hu or CV2/CRMP5 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 80: 412–416.
163. Horwich MS, Cho L, Porro RS, et al. Subacute sensory neuropathy: A remote effect of carcinoma. *Ann Neurol* 1977; 2: 7–19.
164. Gozzard P, Maddison P. Which antibody and which cancer in which paraneoplastic syndromes? *Pract Neurol* 2010; 10: 260–270.
165. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, et al. Anti-Hu--associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992; 71: 59–72.
166. Antoine JC, Robert-Varvat F, Maisonobe T, et al. Testing the validity of a set of diagnostic criteria for sensory neuropathies: a francophone collaborative study. *J Neurol* 2014; 261: 2093–2100.
167. Antoine JC, Honnorat J, Camdessanché JP, et al. Paraneoplastic anti-CV2 antibodies react with peripheral nerve and are associated with a mixed axonal and demyelinating peripheral neuropathy. *Ann Neurol* 2001; 49: 214–221.
168. Sadeghian H, Vernino S. Progress in the management of paraneoplastic neurological disorders. *Ther Adv Neurol Disord* 2010; 3: 43–52.
169. Bain PG, Motomura M, Newsom-Davis J, et al. Effects of intravenous immunoglobulin on muscle weakness and calcium-channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 1996; 47: 678–683.
170. Rojas I, Graus F, Keime-Guibert F, et al. Long-term clinical outcome of paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. *Neurology* 2000; 55: 713–715.

171. Rosenfeld MR, Dalmau J. Current Therapies for Paraneoplastic Neurologic Syndromes. *Curr Treat Options Neurol* 2003; 5: 69–77.
172. Keime-Guibert F, Graus F, Fleury A, et al. Treatment of paraneoplastic neurological syndromes with antineuronal antibodies (Anti-Hu, Anti-Yo) with a combination of immunoglobulins, cyclophosphamide, and methylprednisolone. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68: 479–482.
173. Widdess-Walsh P, Tavee JO, Schuele S, et al. Response to intravenous immunoglobulin in anti-Yo associated paraneoplastic cerebellar degeneration: case report and review of the literature. *J Neurooncol* 2003; 63: 187–190.
174. Vernino S, O'Neill BP, Marks RS, et al. Immunomodulatory treatment trial for paraneoplastic neurological disorders. *Neuro Oncol* 2004; 6: 55–62.
175. Dropcho EJ. Immunotherapy for paraneoplastic neurological disorders. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 1339–1348.
176. Sillevs Smitt P, Grefkens J, De Leeuw B, et al. Survival and outcome in 73 anti-Hu positive patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *J Neurol* 2002; 249: 745–753.
177. Bouchard C, Lacroix C, Planté V, et al. Clinicopathologic findings and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 1999; 52: 498–503.
178. Krendel DA, Parks HP, Anthony DC, et al. Sural nerve biopsy in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 1989; 12: 257–264.
179. Schmidt B, Toyka K V, Kiefer R, et al. Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Muscle Nerve* 1996; 19: 474–87.
180. Mathey EK, Park SB, Hughes R a. C, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015; 86: 973–985.
181. Dalakas MC, Engel WK. Immunoglobulin and Complement Deposits in Nerves of Patients With Chronic Relapsing Polyneuropathy. *Arch Neurol* 1980; 37: 637–640.
182. Devaux JJ, Odaka M, Yuki N. Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barré syndrome. *J Peripher Nerv Syst* 2012; 17: 62–71.
183. Koike H, Kadoya M, Kaida KI, et al. Paranodal dissection in chronic inflammatory

- demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017; 88: 465–473.
184. Doppler K, Appeltshauser L, Wilhelmi K, et al. Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015; 1: 1–9.
185. Vallat JM, Yuki N, Sekiguchi K, et al. Paranodal lesions in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with anti-Neurofascin 155 antibodies. *Neuromuscul Disord* 2017; 27: 290–293.
186. Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, et al. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2001; 64: 109–127.
187. Press R, Pashenkov M, Jin JP, et al. Aberrated levels of cerebrospinal fluid chemokines in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Clin Immunol* 2003; 23: 259–267.
188. Kieseier BC, Tani M, Mahad D, et al. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: A central role for IP-10. *Brain* 2002; 125: 823–834.
189. Sommer C, Koch S, Lammens M, et al. Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology* 2005; 65: 1924–1929.
190. Schneider-Hohendorf T, Schwab N, Uçeyler N, et al. CD8+ T-cell immunity in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology* 2012; 78: 402–8.
191. Mausberg AK, Dorok M, Stettner M, et al. Recovery of the T-cell repertoire in CIDP by IV immunoglobulins. *Neurology* 2013; 80: 296–303.
192. Staudt M, Diederich JM, Meisel C, et al. Differences in peripheral myelin antigen-specific T cell responses and T memory subsets in atypical versus typical CIDP. *BMC Neurol* 2017; 17: 1–7.
193. Chi LJ, Xu WH, Zhang ZW, et al. Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2010; 15: 345–56.
194. Hartung H-P, Reiners K, Schmidt B, et al. Serum interleukin-2 concentrations in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy: Comparison with other neurological diseases of presumed



- immunopathogenesis. *Ann Neurol* 1991; 30: 48–53.
195. Mahad DJ, Howell SJL, Woodroffe MN. Expression of chemokines in cerebrospinal fluid and serum of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73: 320–323.
196. Maimone D, Annunziata P, Simone IL, et al. Interleukin-6 Levels in the Cerebrospinal-Fluid and Serum of Patients With Guillain-Barre-Syndrome and Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1993; 47: 55–62.
197. Oka N, Akiguchi I, Kawasaki T, et al. Elevated serum levels of endothelial leukocyte adhesion molecules in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 1994; 35: 621–624.
198. Kuwabara S, Nakajima M, Matsuda S, et al. Magnetic resonance imaging at the demyelinating foci in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 1997; 48: 874–877.
199. Yan WX, Taylor J, Andrias-Kauba S, et al. Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Ann Neurol* 2000; 47: 765–75.
200. Nagelkerke SQ, Kuijpers TW. Immunomodulation by IVIg and the Role of Fc-Gamma Receptors: Classic Mechanisms of Action after all? *Front Immunol* 2014; 5: 674.
201. Tackenberg B, Jelcic I, Baerenwaldt A, et al. Impaired inhibitory Fcγ receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 4788–92.
202. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 34–47.
203. Espéli M, Clatworthy MR, Bökers S, et al. Analysis of a wild mouse promoter variant reveals a novel role for FcγRIIb in the control of the germinal center and autoimmunity. *J Exp Med* 2012; 209: 2307–19.
204. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch J V. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 2001; 291: 484–486.
205. Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW, et al. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity* 2003; 18: 573–81.

206. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch J V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 2006; 313: 670–673.
207. Kaneko Y, Nimmerjahn F, Madaio MP, et al. Pathology and protection in nephrotoxic nephritis is determined by selective engagement of specific Fc receptors. *J Exp Med* 2006; 203: 789–97.
208. Milner P, Lovelidge CA, Taylor WA, et al. P0myelin protein produces experimental allergic neuritis in Lewis rats. *J Neurol Sci* 1987; 79: 275–285.
209. Kadlubowski M, Hughes RA. Identification of the neuritogen for experimental allergic neuritis. *Nature* 1979; 277: 140–1.
210. Gabriel CM, Hughes RAC, Moore SE, et al. Induction of experimental autoimmune neuritis with peripheral myelin protein-22. *Brain* 1998; 121: 1895–1902.
211. Allen D, Giannopoulos K, Gray I, et al. Antibodies to peripheral nerve myelin proteins in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2005; 10: 174–80.
212. Khalili-Shirazi A, Atkinson P, Gregson N, et al. Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1993; 46: 245–251.
213. Gabriel CM, Gregson N a, Hughes R a. Anti-PMP22 antibodies in patients with inflammatory neuropathy. *J Neuroimmunol* 2000; 104: 139–46.
214. Ritz MF, Lechner-Scott J, Scott RJ, et al. Characterisation of autoantibodies to peripheral myelin protein 22 in patients with hereditary and acquired neuropathies. *J Neuroimmunol* 2000; 104: 155–63.
215. Inglis HR, Csurhes PA, McCombe PA. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 419–22.
216. Fredman P, Vedeler CA, Nyland H, et al. Antibodies in sera from patients with inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy react with ganglioside LM1 and sulphatide of peripheral nerve myelin. *J Neurol* 1991; 238: 75–79.
217. Yuki N, Tagawa Y, Handa S. Autoantibodies to peripheral nerve glycosphingolipids SPG, SLPG, and SGPG in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 1996; 70: 1–6.
218. Ilyas AA, Mithen FA, Dalakas MC, et al. Antibodies to acidic glycolipids in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

- J Neurol Sci* 1992; 107: 111–21.
219. Meléndez-Vásquez C, Redford J, Choudhary P., et al. Immunological investigation of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1997; 73: 124–134.
220. Kuwahara M, Suzuki H, Samukawa M, et al. Clinical features of CIDP with LM1-associated antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84: 573–5.
221. Lonigro A, Devaux JJ. Disruption of neurofascin and gliomedin at nodes of Ranvier precedes demyelination in experimental allergic neuritis. *Brain* 2009; 132: 260–273.
222. Cifuentes-Diaz C, Dubourg O, Irinopoulou T, et al. Nodes of ranvier and paranodes in chronic acquired neuropathies. *PLoS One* 2011; 6 (1).
223. Miura Y, Devaux JJ, Fukami Y, et al. Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain* 2015; 1–8.
224. Ogata H, Yamasaki R, Hiwatashi A, et al. Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol* 2015; 2: 960–71.
225. Devaux JJ, Miura Y, Fukami Y, et al. Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2016; 86: 800–7.
226. Martínez-Martínez L, Lleixà MC, Boera-Carnicero G, et al. Anti-NF155 chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy strongly associates to HLA-DRB15. *J Neuroinflammation* 2017; 14 (1).
227. Plante-Bordeneuve V, Baudrimont M, Gorin NC, et al. Subacute sensory neuropathy associated with Hodgkin's disease. *J Neurol Sci* 1994; 121: 155–158.
228. Ichimura M, Yamamoto M, Kobayashi Y, et al. Tissue distribution of pathological lesions and Hu antigen expression in paraneoplastic sensory neuronopathy. *Acta Neuropathol* 1998; 95: 641–648.
229. Ohnishi A, Ogawa M. Preferential loss of large lumbar primary sensory neurons in carcinomatous sensory neuropathy. *Ann Neurol* 1986; 20: 102–4.
230. Oki Y, Koike H, Iijima M, et al. Ataxic vs painful form of paraneoplastic neuropathy. *Neurology* 2007; 69: 564–572.
231. Bernal F, Graus F, Pifarré À, et al. Immunohistochemical analysis of anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 2002; 103: 509–515.
232. 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.

233. Voltz R, Dalmau J, Posner JB, et al. T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology* 1998; 51: 1146–50.
234. Albert ML, Darnell JC, Bender A, et al. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* 1998; 4: 1321–1324.
235. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology* 1985; 35: 538–543.
236. Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, et al. Anti-Ri: An antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol* 1991; 29: 241–251.
237. Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology* 1992; 42: 1931–7.
238. Folli F, Solimena M, Cofield R, 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.
239. Honnorat J, Antoine JC, Derrington E, et al. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61: 270–8.
240. Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, et al. A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Engl J Med* 1999; 340: 1788–95.
241. Bernal F, Shams'ili S, Rojas I, et al. Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Neurology* 2003; 60: 230–4.
242. Sabater L, Titulaer M, Saiz A, et al. SOX1 antibodies are markers of paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 2008; 70: 924–928.
243. Steck A, Yuki, N; Graus F. Antibody testing in peripheral nerve disorders. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., 2013.
244. Taieb G, Renard D, Deverdal M, et al. Pure monomelic sensory neuronopathy associated with anti-yo antibodies. *Muscle Nerve* 2012; 45: 297–8.
245. Ayrygnac X, Castelnovo G, Landrault E, et al. Mononeuropathie multiple et anticorps anti-Ma2. *Rev Neurol (Paris)* 2008; 164: 608–611.
246. Coppens T, Van Den Bergh P, Duprez TJ, et al. Paraneoplastic rhombencephalitis and brachial plexopathy in two cases of amphiphysin auto-immunity. *Eur Neurol* 2006; 55: 80–83.

247. Antoine J, Camdessanche J. Paraneoplastic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2017; 30: 513–520.
248. Graus F, Ariño H, Dalmau J. Paraneoplastic neurological syndromes in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2014; 123: 3230–3238.
249. Graus F, Illa I, Agusti M, et al. Effect of intraventricular injection of an anti-Purkinje cell antibody (anti-Yo) in a guinea pig model. *J Neurol Sci* 1991; 106: 82–87.
250. Sillevius Smitt PAE, Manley GT, Posner JB. Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. *Neurology* 1995; 45: 1873–1878.
251. Carpentier AF, Rosenfeld MR, Delattre JY, et al. DNA vaccination with HuD inhibits growth of a neuroblastoma in mice. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2819–2824.
252. Graus F, Saiz A, Dalmau J. Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS. *J Neurol* 2010; 257: 509–517.
253. Honnorat J, Viaccoz A. New concepts in paraneoplastic neurological syndromes. *Rev Neurol (Paris)* 2011; 167: 729–736.
254. Bekircan-Kurt CE, Derle Çiftçi E, Kurne AT, et al. Voltage gated calcium channel antibody-related neurological diseases. *World J Clin cases* 2015; 3: 293–300.
255. Van Sonderen A, Ariño H, Petit-Pedrol M, et al. The clinical spectrum of Caspr2 antibody-associated disease. *Neurology* 2016; 87: 521–528.
256. Torres-Vega E, Mancheño N, Cebrián-Silla A, et al. Netrin-1 receptor antibodies in thymoma-associated neuromyotonia with myasthenia gravis. *Neurology* 2017; 88: 1235–1242.





