




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

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>

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE BIOMARCADORES EN PACIENTES CON
SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ**

Autora: Cinta Lleixà Rodríguez

Director: Dr. Luis Antonio Querol Gutiérrez

Tutora: Dr. Isabel Illa Sendra



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

2022

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado del trabajo y la presencia de muchas personas que, consciente o inconscientemente, me han ayudado y han sido mi soporte durante todos estos años.

Gracias a Luis, por apostar por mí desde el primer momento en la dirección de esta tesis. Por darme libertad y confiar en mis posibilidades mucho más que yo misma. Por haberme ayudado a crecer profesional y personalmente.

Gràcies a la Isabel i a l'Eduard, per haver-me permès entrar al grup de Neuromuscular i haver-me donat l'oportunitat d'una primera feina, per haver confiat sempre en mi i haver-me ensenyat tantíssim de laboratori.

Gràcies a tots els meus companys de Neuromuscular, els que estan i els que ja han agafat altres camins, perquè m'he sentit sempre molt estimada i acompanyada:

Gràcies al Xavi, per ser referent i per haver parlat bé de mi ara fa 8 anys; tot i que probablement vaig ser una de les pitjors estudiant de pràctiques que ha passat per aquest laboratori. Gràcies a la Noemí, la Fina i la Sonia, per haver estat exemples de dones fortes, treballadores i lluitadores; per haver-me ensenyat tantes coses dins i fora del laboratori.

Gracias a Elba y Lorena por haber sido las mejores compañeras en este viaje, porque somos la definición de trabajo en equipo. A Ana y Esther por haber sido mi soporte y mi guía. Trabajar entre amigas ha sido, sin duda, lo mejor que me llevo de esta tesis. Que sigamos creciendo, compartiendo y viajando juntas muchos años más.

Gracias a Patri, Ana Siles., Rodrigo, Jorge, Marta y una vez más a Xavi, Sonia, Elba, Lorena, Ana y Esther; por las bodas, las cervezas, y las risas. Por haber creado un ambiente de trabajo al que cada mañana apetece volver. Gràcies també a la Núria, el Jordi, el Ricard, la Montse, l'Elena, la Janina, i el David, per tot el vostre suport i coneixement.

A mis compañeros y compañeras del servicio de Inmunología, por el trabajo conjunto y las colaboraciones, por haberme abierto las puertas de vuestro grupo y hacerme sentir siempre como en casa. En especial, gracias a Laura, por darme libertad con mis horarios locos, por confiar en mí y por estar siempre disponible.

A les 11 integrants de la família que un dia vaig escollir i a les germatietes, per la vostra presència activa en tots els moments de la meva vida, i per ser el meu motor quan sembla

que res funciona. Al Teo i el Noa, i als que vindran, per ser l'espurna del futur, per haver-me fet veure que ja ens hem fet grans però seguim i seguirem creixent juntes. Als meus Esutaquis, amb els que vaig començar en el camí de la ciència, i amb els que vaig aprendre que, al final, compartir vida és el més important.

A mi familia, por haberme dado siempre la libertad de escoger el camino que yo quisiera, por no juzgar nunca mis decisiones y por admirarme como si trabajase en la NASA. A Rubén, por quererme y aguantarme sin límites, por ser mi hogar.

Gracias también a los animales que han tenido que ser sacrificados en este estudio, por haberme hecho luchar contra mis emociones y haberme hecho ver lo importantes que son para que todo avance.

Gracias sobre todo a los pacientes, que son el motivo final de nuestras investigaciones, por ayudarnos a dar pequeños pasos que ojalá algún día les puedan servir a ellos.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AIDP: Polineuropatía inflamatoria desmielinizante aguda

AMAN: Neuropatía axonal motora aguda

AMSAN: Neuropatía axonal sensitivo-motora aguda

BHN: Barrera hemato-nerviosa

CASPR1: Proteína asociada a la contactina-1

CIDP: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica

CMT: Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

CNTN1: Contactina-1

CON: Controles

CPA: Células presentadoras de antígenos

DENV: Virus Dengue

DO: densidad óptica

EAN: Neuritis autoinmune experimental

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

GDR: Ganglio raquídeo dorsal

GDS: GBS disability score

HEK: Células embrionarias de riñón humano

HLA: Antígeno linfocítico humano

IC: Intervalo de confianza

ICC: Inmunocitoquímica

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IGOS: International GBS Outcome Study

IHC: Inmunohistoquímica

IL: Interleuquina

IP: Inmunoprecipitación

Kv: Potasio-voltaje dependiente

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LOS: lipooligosacáridos

MAG: Glicoproteína asociada a mielina

MGUS: Neuropatía asociada a gammapatía monoclonal IgM de significado incierto

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

Nav: Sodio-voltaje dependiente

NF140: Neurofascina-140

NF155: Neurofascina-155

NF186: Neurofascina-186

NfL: Neurofilamentos de cadena ligera

NMM: Neuropatía motora multifocal

OR: Odds-ratio

PFA: Paraformaldehído

PMP: Proteína de mielina periférica

SGB: Síndrome de Guillain-Barré

SMF: Síndrome de Miller Fisher

SNP: Sistema nervioso periférico

TMB: Tetrametilbencidina

TNF: Factor de necrosis tumoral

ZIKV: Virus Zika

ZIKV-CON: Pacientes con infección por ZIKV sin complicaciones neurológicas

ZIKV-OEN: Pacientes con infección por ZIKV y otras enfermedades neurológicas inflamatorias

ZIKV-SGB: Síndrome de Guillain-Barré post-infección por virus Zika

ÍNDICE:

RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 El sistema nervioso periférico.....	17
1.1.1 Estructura del nervio periférico y tipos de fibra nerviosa.....	17
1.1.1.1 Células de Schwann y mielina.....	19
1.1.1.2 Estructura de las fibras mielinizadas.....	20
1.1.2 Inmunología del nervio periférico.....	23
1.1.2.1 La barrera hemato-nerviosa.....	23
1.1.2.2 Inmunidad celular.....	25
1.1.2.3 Inmunidad humoral: autoanticuerpos.....	26
1.2 Neuropatías inflamatorias.....	27
1.2.1 Síndrome de Guillain-Barré (SGB).....	28
1.2.1.1 Variantes clínicas y electrofisiológicas del SGB.....	29
1.2.1.2 Fisiopatología del SGB.....	31
1.2.1.2.1 Histopatología.....	31
1.2.1.2.2 Inmunidad humoral y mimética molecular.....	34
1.2.1.2.2.1 Anticuerpos antigangliósidos.....	35
1.2.1.2.2.2 Anticuerpos contra proteínas nodales y paranodales.....	38
1.2.1.2.2.3 Otros autoanticuerpos.....	38
1.2.1.3 SGB post-infección por virus Zika (ZIKV-SGB).....	39
1.2.1.3.1 Virus Zika: estructura y transmisión.....	39
1.2.1.3.2 Historia y epidemiología.....	41
1.2.1.3.3 Caracterización de los pacientes ZIKV-SGB.....	42
1.2.1.3.4 Fisiopatología del ZIKV-SGB.....	43
1.2.1.3.4.1 Mímica molecular.....	44
1.2.1.3.4.2 Reactividad cruzada y potenciación dependiente de anticuerpos.....	46
1.2.1.3.4.3 Respuesta de las células T autoreactivas.....	47
1.2.1.3.4.4 Daño viral directo.....	48
1.3 Relevancia de la detección de nuevos autoanticuerpos en el SGB.....	49

2. HIPÓTESIS	51
2.1 Hipótesis general.....	53
2.2 Hipótesis específicas.....	53
3. OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo general.....	57
3.2 Objetivos específicos.....	57
4. MATERIAL Y MÉTODOS	59
4.1 Pacientes y recogida de datos.....	61
4.1.1 Pacientes con SGB esporádico.....	61
4.1.2 Pacientes con ZIKV-SGB.....	62
4.2 Determinación de autoanticuerpos conocidos.....	63
4.2.1 Determinación de anticuerpos anti-nodo/paranodales.....	63
4.2.2 Determinación de anticuerpos anti-gangliósido.....	64
4.3 Detección de nuevos autoanticuerpos contra estructuras nerviosas.....	65
4.3.1 Inmunocitoquímica en neuronas murinas de ganglio raquídeo dorsal.....	65
4.3.2 Inmunocitoquímica en neuronas humanas derivadas de neuroblastoma.....	66
4.3.3 Inmunocitoquímica en células de Schwann murinas.....	66
4.3.4 Inmunohistoquímica en nervio periférico de mono.....	67
4.3.5 Inmunoprecipitación.....	68
4.3.6 Validación de antígenos candidatos.....	68
4.4 Análisis estadístico.....	70
5. RESULTADOS	73
5.1 Estudio en pacientes con SGB esporádico.....	75
5.1.1 Características basales de los pacientes.....	75
5.1.2 Protocolo general.....	75
5.1.3 Cribado de autoanticuerpos conocidos.....	75
5.1.4 Autoanticuerpos contra neuronas del nervio periférico.....	77
5.1.5 Autoanticuerpos contra tejido nervioso periférico.....	79
5.1.6 Análisis combinado de la detección de autoanticuerpos.....	83
5.1.7 Correlaciones clínico-inmunológicas.....	85
5.1.8 Valor pronóstico de los anticuerpos anti-gangliósido.....	86

5.2 Estudio en pacientes con ZIKV-SGB.....	88
5.2.1 Características basales de los pacientes.....	88
5.2.2 Protocolo general.....	89
5.2.3 Cribado de autoanticuerpos conocidos.....	89
5.2.4 Autoanticuerpos contra neuronas del nervio periférico.....	90
5.2.5 Análisis y validación de antígenos candidatos.....	92
5.2.6 Análisis combinado de la reactividad en pacientes con SGB esporádico y pacientes con ZIKV-SGB.....	94
6. DISCUSIÓN.....	95
7. CONCLUSIONES.....	103
8. LÍNEAS DE FUTURO.....	107
9. BIBLIOGRAFÍA.....	111
10. ANEXO.....	129

RESUMEN

El síndrome de Guillain-Barré (SGB) es una neuropatía inflamatoria aguda con una presentación heterogénea. Los mecanismos inmunopatogénicos exactos del SGB se conocen parcialmente; se considera una enfermedad autoinmune postinfecciosa paradigmática. Aunque existe evidencia que apoya el papel de los autoanticuerpos en su patogénesis, y los anticuerpos anti-gangliósido se detectan hasta en la mitad de los pacientes con SGB, los antígenos diana siguen siendo desconocidos en una proporción sustancial de pacientes.

Uno de los agentes infecciosos que pueden provocar SGB es el virus del Zika (ZIKV). Los recientes brotes de este virus en Sudamérica y Centroamérica han puesto de manifiesto esta asociación, pero todavía se desconocen los mecanismos involucrados en su patogénesis. El mimetismo molecular observado entre otros agentes infecciosos y algunos componentes del nervio periférico sugiere que el SGB en pacientes que han sufrido infección por virus Zika se podría desarrollar por un mecanismo de autoinmunidad postinfecciosa.

Para tratar de dilucidar los objetivos de la respuesta humoral en el SGB, realizamos un cribado exhaustivo de autoanticuerpos séricos dirigidos a tejido nervioso periférico, células y antígenos purificados en una cohorte española de SGB que incluye 100 pacientes diversos desde el punto de vista clínico y desde el punto de vista de antecedente infeccioso (SGB esporádico), y en una cohorte colombiana de 31 pacientes con SGB con antecedente de infección por ZIKV (ZIKV-SGB) representando una cohorte más homogénea desde el punto de vista clínico y de germen desencadenante.

En el caso de la cohorte española de SGB, el cribado incluyó el testado de anticuerpos antigangliósidos y anticuerpos anti-nodo/paranodales; inmunocitoquímica (ICC) en neuronas motoras humanas derivadas de neuroblastoma y en neuronas murinas de los ganglios de la raíz dorsal (GRD), e inmunohistoquímica (IHC) en secciones de nervio periférico de mono. Se analizaron los patrones de tinción de los pacientes y los controles. También se analizó el valor pronóstico de los anticuerpos antigangliósidos.

Ninguno de los pacientes con SGB reaccionó contra las proteínas nodo/paranodales analizadas, y 61 (61%) fueron positivos para, al menos, un anticuerpo antigangliósido. Los sueros de SGB reaccionaron contra las neuronas de GRD con mayor frecuencia que los

controles, tanto en IgG (6% vs 0%) como en IgM (11% vs 2,2%). No se observaron diferencias en la proporción de pacientes que reaccionaron contra las motoneuronas humanas derivadas de neuroblastoma. La reactividad contra tejido nervioso de mono se detectó con frecuencia tanto en los pacientes como en los controles, pero sólo se detectaron patrones específicos en los pacientes con SGB: las IgG de 13 (13%) pacientes reaccionaron contra las células de Schwann. Por último, confirmamos que los anticuerpos IgG anti-GM1 se asocian con peores resultados independientemente de otros factores pronósticos conocidos.

En el cribado de la cohorte de pacientes ZIKV-SGB se analizaron también los anticuerpos antigangliósidos y anti-nodo/paranodales; y se realizó ICC en neuronas de GRD y células de Schwann (CS) de rata. Se compararon 31 pacientes con ZIKV-SGB con 99 pacientes infectados por el ZIKV sin SGB y 47 controles sin ZIKV.

Ninguno de los pacientes fue positivo para ningún anticuerpo anti-nodo/paranodal, y no se observó ninguna asociación significativa con ningún anticuerpo antigangliósido. En general, la reactividad de los anticuerpos IgG a las CS (6,5%) y de los anticuerpos IgM frente a las neuronas de GRD (32,3%) y las CS (19,4%) fue significativamente mayor, en el grupo ZIKV-SGB en comparación con todos los controles. En los sueros ZIKV-SGB positivos se realizó inmunoprecipitación (IP) y espectrometría de masas, y los antígenos candidatos se validaron mediante ELISA y ensayos basados en células; aunque no se pudo confirmar ninguno de ellos como nuevo autoanticuerpo en el ZIKV-SGB.

Por lo tanto, nuestro estudio confirma que (1) los pacientes con SGB muestran un repertorio heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos a células y estructuras nerviosas aunque el antecedente infeccioso sea homogéneo, (2) los gangliósidos son los antígenos más frecuentes en los pacientes con SGB y tienen un valor pronóstico, (3) nuevos experimentos de descubrimiento de autoanticuerpos pueden dilucidar otros antígenos diana en el SGB.

ABSTRACT

Guillain-Barré syndrome (GBS) is an acute inflammatory neuropathy with a heterogeneous presentation. The exact immunopathogenic mechanisms of GBS are partially known, but it is considered a paradigmatic post-infectious autoimmune disease. Although some evidence supports the role of autoantibodies in its pathogenesis, and anti-ganglioside antibodies are detected in up to half of GBS patients, the target antigens remain unknown in a substantial proportion of patients.

One of the infectious agents that can cause GBS is Zika virus (ZIKV). Recent outbreaks of this virus in South and Central America have highlighted this association, but the mechanisms involved in its pathogenesis are still unknown. The molecular mimicry observed between other infectious agents and some components of the peripheral nerve suggests that GBS in patients with ZIKV infection may develop by a mechanism of postinfectious autoimmunity.

To try to elucidate the targets of the humoral response in GBS, we performed a comprehensive screening of serum autoantibodies targeting peripheral nerve tissue, cells and purified antigens in a Spanish GBS cohort including 100 patients with diverse presentations and infectious triggers (sporadic GBS), and in a Colombian cohort of 31 GBS patients with a history of ZIKV infection (ZIKV-GBS) representing a homogeneous cohort in their clinical presentation and infectious trigger.

In the case of the Spanish GBS cohort, screening included testing for anti-ganglioside and anti-nodal/paranodal antibodies; immunocytochemistry (ICC) in human neuroblastoma-derived motor neurons and murine dorsal root ganglion neurons (DRG), and immunohistochemistry (IHC) in monkey peripheral nerve sections. Staining patterns of patients and controls were analysed. The prognostic value of anti-ganglioside antibodies was also analysed.

None of the GBS patients reacted against the tested nodal/paranodal proteins, and 61 (61%) were positive for at least one anti-ganglioside antibody. GBS sera reacted against DRG neurons more frequently than controls for both IgG (6% vs 0%) and IgM (11% vs 2.2%). No differences were observed in the proportion of patients reacting against neuroblastoma-derived human motor neurons. Reactivity against monkey nerve tissue was frequently

detected in both patients and controls, but specific patterns were only detected in GBS patients: IgG from 13 (13%) patients reacted against Schwann cells. Finally, we confirmed that IgG anti-GM1 antibodies are associated with poorer outcomes independently of other known prognostic factors.

Screening of the ZIKV-GBS cohort also included anti-ganglioside and anti-nodal/paranodal antibodies testing; and ICC on rat DRG neurons and Schwann cells (SC). Thirty-one patients with ZIKV-GBS were compared with 99 ZIKV-infected patients without GBS and 47 controls without ZIKV infection.

None of the patients were positive for any nodal/paranodal antibody, and no significant association was observed with any anti-glycolipid antibody. Overall, the reactivity of IgG antibodies to SC (6.5%) and IgM antibodies to DRG neurons (32.3%) and SC (19.4%) was significantly higher in the ZIKV-GBS group compared to all controls. Immunoprecipitation (IP) and mass spectrometry were performed on ZIKV-GBS-positive sera, and candidate antigens were validated by ELISA and cell-based assays; however, none of them could be confirmed as a novel autoantibody in ZIKV-GBS.

Therefore, our study confirms that (1) patients with GBS show a heterogeneous repertoire of autoantibodies targeting nerve cells and structures even if the infectious background is homogeneous, (2) gangliosides are the most frequent antigens in GBS patients and have prognostic value, (3) new autoantibody discovery experiments may elucidate other potential antigens in GBS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema nervioso periférico

El sistema nervioso periférico (SNP) es el sistema encargado de comunicar el sistema nervioso central (formado por el cerebro y la médula espinal) con el resto de tejidos y órganos del cuerpo. Éste está formado por los nervios periféricos, los ganglios raquídeos dorsales, los pares craneales, las raíces nerviosas, los nervios raquídeos y las terminaciones nerviosas especializadas. Los nervios periféricos se pueden clasificar como motores (eferentes), sensitivos (aferentes) o mixtos, en función del tipo de neuronas que los formen. (1)

1.1.1 Estructura del nervio periférico y tipos de fibra nerviosa

Las fibras nerviosas que conforman los nervios periféricos están constituidas por grupos de axones recubiertos de células de Schwann y protegidos por el tejido conectivo circundante llamado **endoneuro**, que separa las distintas fibras nerviosas. A su vez, las fibras se agrupan formando fascículos envueltos de una capa de tejido conectivo llamada **perineuro**, que contiene células perineurales de origen fibroblástico y colágeno. Varios fascículos nerviosos están agrupados dentro de otra capa de tejido conectivo llamada **epineuro**. El epineuro participa en la fijación del nervio dentro de las estructuras colindantes, y contiene la red linfática y vascular (*vasa nervorum*), que cruza el perineuro para comunicar con la red de arteriolas y vénulas del endoneuro. (2)

Las características funcionales del axón de una fibra nerviosa determinan su morfología y la de la célula de Schwann que le da soporte. El **axón** es la prolongación cilíndrica del citoplasma de una neurona, cuya función principal es la propagación de las señales eléctricas (conocidas como potenciales de acción) a otras células distantes mediante la apertura de canales de sodio activados por voltaje en microdominios excitables especializados (denominados segmento inicial del axón y nodos de Ranvier) (3). El citoesqueleto axonal tiene una estructura microfibrilar compuesta por tres grandes grupos de proteínas: los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios, incluyendo los neurofilamentos.

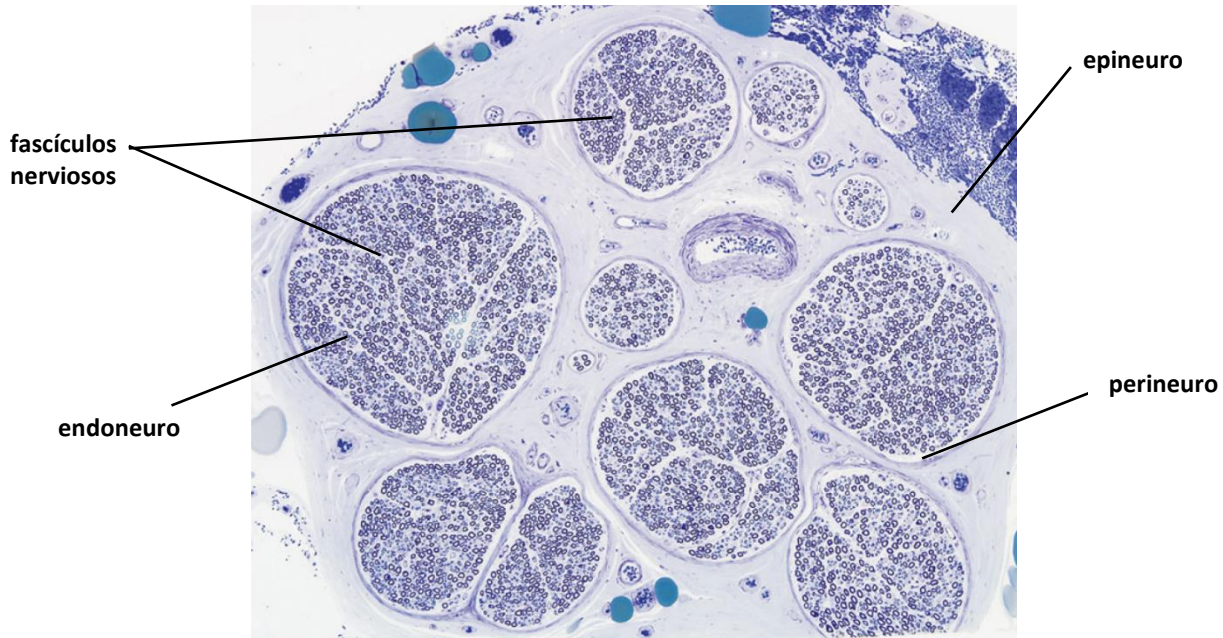


Figura 1. Sección transversal de nervio sural. Adaptada de Bilbao 2015 (4).

Las fibras nerviosas se pueden clasificar en diferentes tipos en función de sus características funcionales, diámetro, velocidad de conducción y presencia o no de vaina de mielina (tabla 1) (4,5).

Clasificación Erlanger y Gasser	Clasificación numérica	Función	Diámetro (µm)	Mielina	Velocidad de conducción (m/s)
A α	Ia	Motor somático, propiocepción (husos musculares)	12-20	Sí	70-120
	Ib	Propiocepción (Órganos de Golgi)	12-20	Sí	70-120
A β	II	Tacto, presión	5-12	Sí	30-70
A γ		Motor (husos musculares)	3-6	Sí	15-30
A δ	III	Dolor (rápido), temperatura, tacto	2-5	Sí	12-30
B		Preganglionar autonómico	<3	Sí	3-15
C	IV	Dolor (lento), temperatura, mecanorreceptores, postganglionar autonómico	0.4-1.2	No	0.5-2

Tabla 1. Clasificación de los tipos de fibras nerviosas. Adaptada de Marani 2012 (5) y de Rigoard 2020 (2).

1.1.1.1 Células de Schwann y mielina

Las células de Schwann son las únicas células gliales del sistema nervioso periférico. Éstas se distribuyen en forma de cadenas longitudinales alrededor de los axones, y tienen un papel esencial en el mantenimiento del axón y en procesos de mielinización y regeneración. (2)

Funcionalmente, existen dos tipos de células de Schwann: las productoras de mielina (mielínicas) y las asociadas a axones no mielinizados (amielínicas o células de Remak).

La **mielina** es una sustancia membranosa multilaminar producida mediante la modificación estructural y bioquímica de la membrana plasmática de las células de Schwann. Está compuesta de fosfolípidos, glicolípidos (cerebrósidos, sulfátidos y gangliósidos), colesterol, y proteínas fisiológicamente importantes como las glicoproteínas P0, P1 y P2, la proteína de mielina periférica (PMP-22) y la glicoproteína asociada a mielina (MAG)(4).

Una **fibra mielinizada** consiste en un axón y una serie de células de Schwann dispuestas longitudinalmente. En este tipo de fibras cada segmento de axón mielinizado está asociado a una sola célula de Schwann. Las fibras mielinizadas pequeñas (que suponen un 55-68% del total) tienen un diámetro de 2 a 6 μm , y las grandes (32-45%) oscilan entre 8 y 12 μm . (4)

Hay una relación de proporcionalidad entre el grosor de la mielina y el diámetro del axón. La mielinización se observa en los axones con un diámetro mayor de 1-1.5 μm . La zona de transición que separa dos segmentos mielinizados se denomina nodo de Ranvier, y el espacio que separa dos nodos de Ranvier se denomina espacio internodal o internodo (2).

Las **fibras no mielinizadas** se encuentran repartidas por todo el fascículo nervioso, pero tienen una localización preferente adyacente a las fibras mielinizadas pequeñas. A diferencia de las células de Schwann mielínicas, las células no mielínicas pueden estar asociadas a varios axones, con el citoplasma de la célula de Schwann envolviendo y aislando por completo cada axón de los axones colindantes. Las fibras no mielinizadas tienen un tamaño de 0.5 a 1.5 μm . En el SNP hay un número 4 veces mayor de axones no mielinizados que de axones mielinizados (4,6).

La mielinización acelera la conducción nerviosa. La conducción del impulso nervioso es continua (ininterrumpida) en las fibras no mielinizadas, alcanzando una velocidad máxima de 15 m/s. En cambio, en las fibras mielinizadas la membrana excitable está restringida a los nodos de Ranvier, ya que la mielina posee propiedades aislantes. Esta conducción se convierte así en saltatoria, de nodo a nodo, y puede alcanzar una velocidad de hasta 120 m/s. La mielinización optimiza el rendimiento energético de la fibra nerviosa. (2)

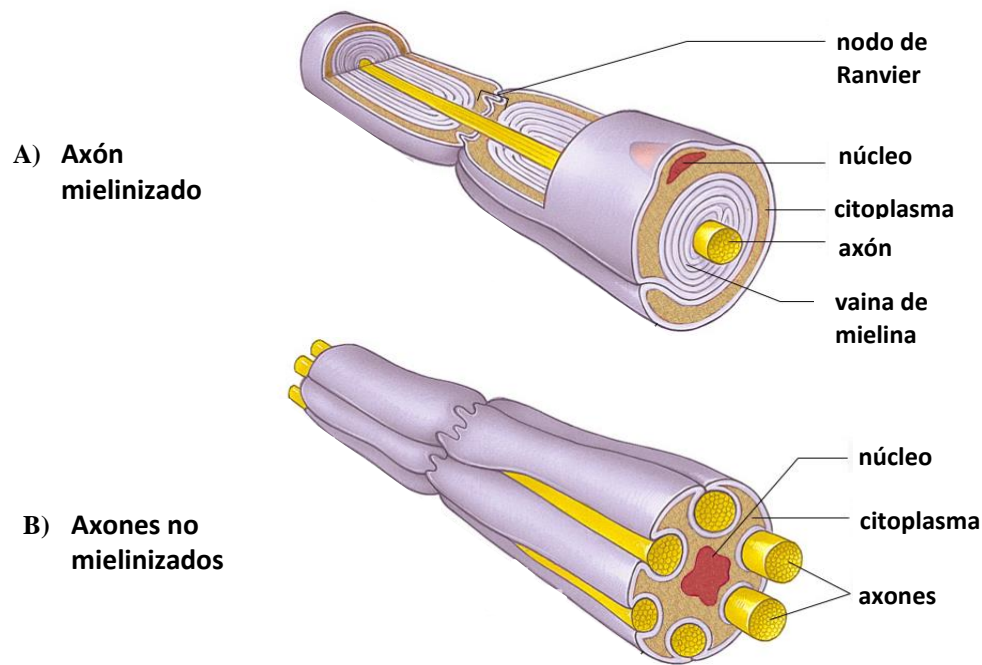


Figura 2. Estructura de las fibras mielinizadas (A) y las fibras no mielinizadas (B). Creada con Biorender.

1.1.1.2 Estructura de las fibras mielinizadas

Tras iniciarse en el segmento inicial del axón, los potenciales de acción deben recorrer rápidamente largas distancias por el axón para llegar a la sinapsis. En los axones mielinizados, la regeneración del potencial de acción se produce en los **nodos de Ranvier**, regiones de 1-2 μm de largo en la que no hay mielina que rodee al axón (2). Los nodos de Ranvier contienen una alta densidad de canales de sodio voltaje dependientes

(especialmente canales Nav1.6) (3), responsables de la entrada masiva de sodio cuando se da un potencial de acción; y canales de potasio (KCMQ2 y KCNQ3) que estabilizan el potencial de reposo y previenen la concatenación de potenciales de acción (7).

Además, el nodo de Ranvier contiene las moléculas de adhesión celular neurofascina 186 (NF186) y NrCAM, que ejercen de puente entre las células de Schwann y el citoesqueleto axonal. En concreto, NF186 y NrCAM se unen a la gliomedina, una proteína glial sintetizada por las células de Schwann (8). A su vez, las proteínas axonales anquirina-G y β IV-espectrina anclan los canales iónicos y las moléculas de adhesión NF186 y NrCAM al citoesqueleto subyacente (9,10).

La vaina de mielina termina a cada lado de un nodo con una **región paranodal**, que flanquea los nodos de Ranvier. Los canales de sodio están restringidos a la región nodal gracias a la unión paranodal formada por la NF155 glial (otra isoforma de la neurofascina) (11) y el complejo CASPR1 – contactina 1 axonal (12); uniendo así los bucles de mielina con el axolema subyacente. Las proteínas anquirina-B de la membrana paranodal de las células de Schwann se unen a la molécula de adhesión celular NF155, contribuyendo al ensamblaje y mantenimiento del nodo de Ranvier (3,4).

Los **yuxtaparanodos** flanquean los paranodos y tienen una gran cantidad de canales de potasio voltaje dependientes (Kv1.1 y Kv1.2) (10), que modulan la conducción de los potenciales de acción y ayudan a mantener el potencial de reposo internodal (3). El anclaje de los canales de potasio al citoesqueleto axonal está mediado por la proteína 4.1.B y las espectrinas α II y β II. El complejo formado por las moléculas de adhesión celular CASPR2 y TAG-1 (también conocida como contactina 2) es esencial en la organización molecular de las regiones yuxtaparanodales (13).

La región comprendida entre dos yuxtaparanodos es el **internodo**, y corresponde al dominio más amplio de una fibra mielinizada (varía entre 200 y 1800 μ m de longitud, dependiendo del diámetro del axón y de la presencia o no de patología). El internodo también contiene moléculas de adhesión que unen el axón a la membrana de la célula de Schwann, como son las proteínas Necl1, Necl2, Necl4 y la glicoproteína asociada a mielina (MAG) (7).

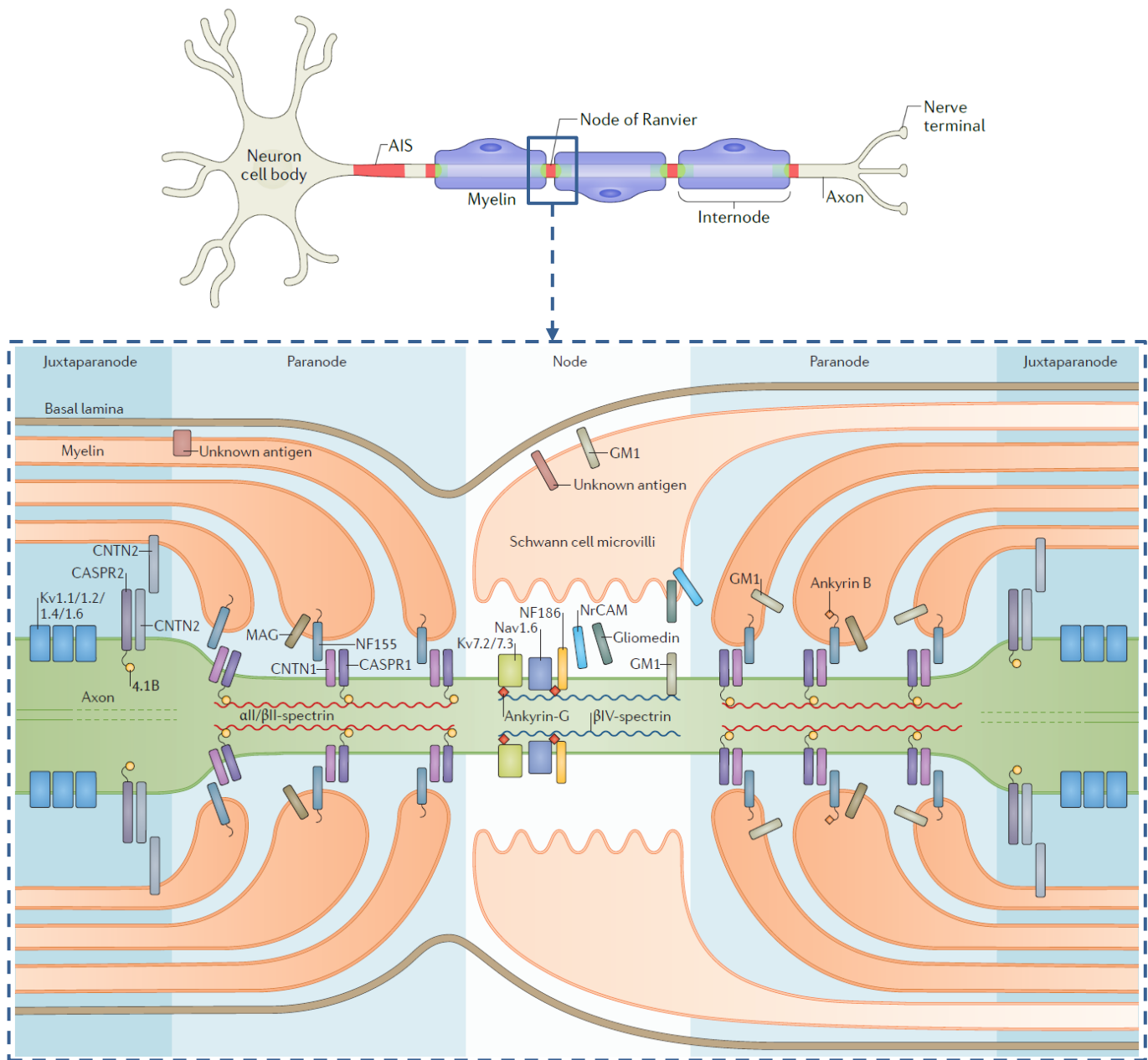


Figura 3. Estructura de una fibra mielinizada. Adaptada de Rasband 2019 (9) y de Querol 2017 (14).

1.1.2 Inmunología del nervio 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, que ofrece protección y es capaz de eliminar la inflamación en el tejido. En este control inmunológico intervienen la barrera hemato-nerviosa (BHN) y una gran variedad de tipos celulares, entre los que se incluyen los linfocitos T y linfocitos B, las células de Schwann y las células presentadoras de antígenos (CPA) como los macrófagos (15). Sin embargo, si los mecanismos de tolerancia inmunológica fallan, las células del sistema inmunitario pueden activarse contra autoantígenos expresados por el nervio periférico dando lugar a neuropatías inmunomediadas, como el síndrome de Guillain-Barré (SGB) o la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) (16).

En la actualidad, el conocimiento de la regulación inmunológica del SNP humano es relativamente limitado y la mayoría de la información proviene del estudio de modelos animales experimentales. El principal modelo de estudio se trata del modelo de neuritis autoinmune experimental (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 (17).

1.1.2.1 La barrera hemato-nerviosa

El SNP está aislado del sistema inmune sistémico por la BHN, que está compuesta por el perineuro y los vasos endoneurales. La BHN impide la difusión directa de células y moléculas solubles del sistema inmune hacia las fibras nerviosas, y su integridad es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis inmune en el SNP. Así, la BHN no es sólo una barrera que separa dos compartimentos, sino una interfaz competente que intercambia activamente materiales entre el microambiente endoneurial y el espacio extracelular o la sangre circundante. Sin embargo, hay varias estructuras vulnerables del SNP que carecen de BHN, incluidos los ganglios raquídeos dorsales, las raíces espinales y las uniones neuromusculares (18).

Dado que el SNP sano está herméticamente cerrado por la BHN, la intrusión de células T patógenas y factores humorales en el parénquima del SNP se produce tras el deterioro de la BHN. Por esta razón, el aumento de la permeabilidad de la BHN es un factor clave en el desarrollo de las neuropatías inmunomediadas. Se ha observado en modelos animales que la ruptura de la BHN es uno de los primeros acontecimientos de la inflamación nerviosa y está mediada por moléculas liberadas por las células inflamatorias del compartimento inmunitario periférico. Este fenómeno puede ser activado por un ataque autoinmune contra el antígeno putativo o por otros estímulos, y permite el acceso de autoanticuerpos, macrófagos y otros mediadores inmunitarios al espacio endoneuronal para provocar daño en el nervio (19).

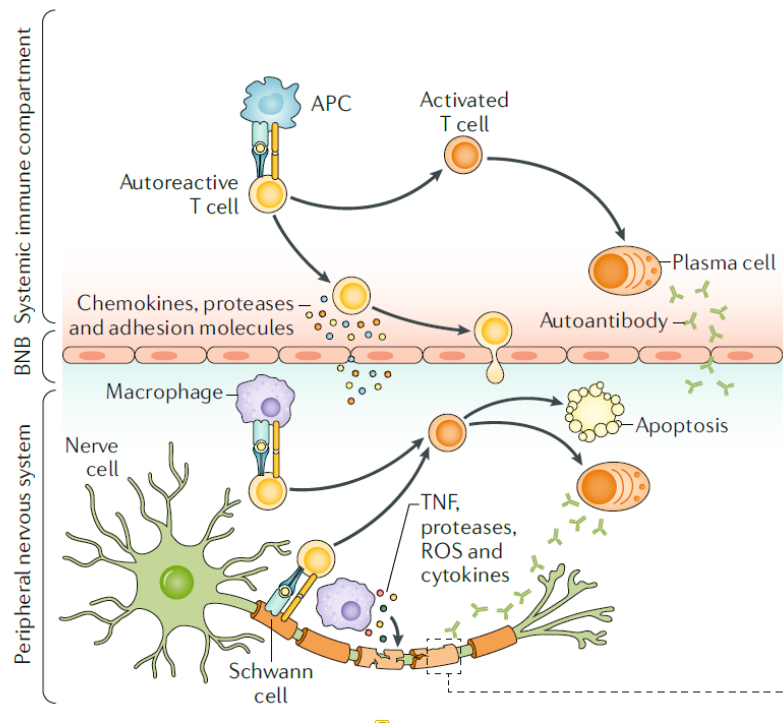


Figura 4. Immunopatogenia de las neuropatías inflamatorias. Adaptada de Kieseier 2018 (20).

La inflamación y el daño inmunitario del nervio se puede desencadenar por ciertos estímulos (como infecciones), que pueden activar e inducir la proliferación de células T autoreactivas (21). Éstas secretan varias citoquinas que estimulan la producción de

autoanticuerpos por parte de las células plasmáticas, que pueden entrar en los nervios periféricos tras dañar la BHN. Las células T activadas atraviesan la BHN mediante interacciones entre moléculas de adhesión de las propias células y el endotelio vascular de los vasos sanguíneos endoneuriales, que permiten que las células T se adhieran a la pared del vaso sanguíneo y crucen la BHN por diapédesis transcelular o intercelular (22). Durante este proceso, las células T activadas secretan metaloproteinasas que degradan la membrana basal, lo que facilita la posibilidad de que moléculas más grandes, así como células inmunitarias, crucen la BHN (16,20).

En pacientes con neuropatías inflamatorias, pueden detectarse niveles elevados de moléculas de adhesión solubles (23), quimiocinas (24,25) y metaloproteinasas de matriz (26) en suero, líquido cefalorraquídeo o biopsias de nervio, lo que indica una migración activa de las células T a través de la BHN.

1.1.2.2 Inmunidad celular

Los antígenos peptídicos son presentados a los linfocitos T por las CPA mediante las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo que permite respuestas específicas de antígeno del sistema inmunitario adaptativo. En el concepto clásico de presentación de antígenos, la mayoría de las células humanas nucleadas expresan y utilizan moléculas del antígeno linfocítico humano (HLA) de clase I para presentar péptidos antigénicos de fuentes endógenas a los **linfocitos T citotóxicos CD8+**. Sólo las CPA profesionales, como las células dendríticas, las células B o los macrófagos, presentan péptidos generados a partir de proteínas exógenas extrañas en moléculas HLA de clase II, que son reconocidas por los **linfocitos T CD4+**. Sin embargo, en el contexto de inflamación en el nervio, las **células de Schwann** pueden actuar también de CPA, procesando y presentando péptidos endógenos y exógenos a los linfocitos T (15,27).

La reactivación de los linfocitos T autoreactivos dentro del nervio periférico se considera uno de los pasos clave en la inmunopatogenia de los trastornos autoinmunes del nervio periférico. La ruptura de la mielina y de los componentes de las células de Schwann puede potenciar el procesamiento y la presentación de determinantes antigénicos por parte de las propias células de Schwann (28). En biopsias de nervios de pacientes con SGB y CIDP se

observó la expresión de MHC de clase II en las células de Schwann, apoyando su papel como CPA en los trastornos inmunomediados del SNP (29,30).

En el nervio periférico (una vez cruzada la BHN), las células T secretan citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), interferón- γ (IFN- γ) o IL-2; que contribuyen a la amplificación y perpetuación de la inflamación dentro del nervio mediante el reclutamiento de células inmunitarias adicionales (como macrófagos) desde la periferia (31,32). Los **macrófagos** activados pueden actuar mediante dos mecanismos: liberando mediadores, como citoquinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno y proteasas, que propagan la respuesta inflamatoria; y dañando directamente las células de Schwann y los axones. Los macrófagos tienen un papel fundamental en la regeneración nerviosa, la desmielinización inflamatoria y la eliminación y reciclaje de los lípidos de la mielina (33).

1.1.2.3 Inmunidad humoral: autoanticuerpos

Uno de los mecanismos clave de la patogénesis de las neuropatías inflamatorias es la respuesta aberrante de las células B contra estructuras nerviosas, provocando la producción de autoanticuerpos, que acceden al endoneuro cuando la BHN aumenta su permeabilidad debido a la infiltración de células inflamatorias (20). Al entrar en el nervio, los anticuerpos pueden actuar mediante diversos mecanismos: pueden dirigir la actividad citotóxica de los macrófagos uniéndose a sus receptores Fc de superficie; pueden opsonizar los antígenos diana, promoviendo su internalización por los macrófagos; o, al unirse a sus dianas antigénicas, pueden activar la vía clásica del complemento; dando como resultado la formación de poros, y permitiendo la entrada de calcio y liberación de proteasas (34).

Se han detectado anticuerpos de diferentes isotipos y múltiples especificidades contra antígenos peptídicos y no peptídicos (glicolípidos) en el suero de pacientes con SGB, CIDP y otras neuropatías inmunomediadas (35). El paradigma clásico del papel de la inmunidad humoral en el nervio periférico son los anticuerpos antigangliósidos observados en pacientes con SGB. Recientemente, se han descrito varios autoanticuerpos que reconocen diferentes antígenos localizados en el paranodo y el nodo de Ranvier en la CIDP y que se asocian a fenotipos clínicos específicos (36).

Además, la patogenicidad de algunos de los anticuerpos descritos en neuropatías inflamatorias ha sido demostrada, como en el caso de los anticuerpos anti-GQ1b o anti-GD1b en el SGB (37,38) y en los anticuerpos paranodales anti-NF155 y anti-CNTN1 en la CIDP (39,40).

La identificación de los antígenos diana implicados en las neuropatías inflamatorias supone un paso crucial en la comprensión de su patogénesis y ha apoyado la idea de que la heterogeneidad clínica de las neuropatías autoinmunes está asociada a la heterogeneidad inmunopatológica. La detección de anticuerpos específicos en 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 supone la aparición de nuevos biomarcadores que pueden ser útiles para el diagnóstico, el pronóstico y el manejo terapéutico de estos pacientes (35).

1.2 Neuropatías inflamatorias

Las neuropatías inflamatorias son un grupo heterogéneo de enfermedades raras del sistema nervioso periférico. Clínicamente se caracterizan por una combinación de síntomas motores y sensitivos que causan una discapacidad importante y que generalmente mejoran con tratamientos inmunomoduladores e inmunosupresores (20).

Estas neuropatías pueden incluir trastornos agudos, como el síndrome de Guillain-Barré (SGB), o trastornos crónicos, como la polirradiculoneuropatía inflamatoria crónica desmielinizante (CIDP), la neuropatía motora multifocal (NMM) y la neuropatía asociada a gammapatía monoclonal IgM de significado incierto (MGUS) (20).

Aunque la etiología y los mecanismos fisiopatológicos de las neuropatías inflamatorias sólo se conocen en parte, se ha demostrado que tanto la inmunidad humoral como la celular desempeñan un papel en su patogénesis. Se han descrito autoanticuerpos contra estructuras del nervio periférico como los gangliósidos o las proteínas del nodo y el paranodo de Ranvier, lo que ha permitido identificar subgrupos de pacientes con fenotipos clínicos específicos (41).

1.2.1 Síndrome de Guillain-Barré (SGB)

El síndrome de Guillain-Barré (SGB) es una neuropatía inflamatoria aguda con una presentación y una patogénesis heterogéneas (42). Estudios en poblaciones de Europa y Estados Unidos sugieren que la incidencia oscila entre 0,9 y 1,9 casos por cada 100.000 personas al año, con predominio del sexo masculino y aumento de la incidencia con la edad (43).

El SGB es clínicamente heterogéneo: la presentación clásica se caracteriza por una debilidad progresiva (ascendente) de las extremidades asociada a una reducción o ausencia de reflejos. Sin embargo, en las variantes clínicas menos típicas, los pacientes pueden presentar debilidad localizada, o incluso un conjunto de características clínicas completamente diferentes a los del SGB clásico, como en el caso del síndrome de Miller Fisher, caracterizado por ataxia, oftalmoparesia y arreflexia (44)(45).

En los pacientes con SGB, los síntomas alcanzan su punto álgido a las 4 semanas des del inicio de la enfermedad, seguidas de un periodo de recuperación que puede durar meses o años, a medida que la respuesta inmunitaria decae y el nervio periférico experimenta un proceso de reparación endógeno (46). Dos tercios de los pacientes con SGB declaran síntomas previos de una infección respiratoria o gastrointestinal en las 4 semanas anteriores a la aparición de la debilidad. Se trata de un trastorno postinfeccioso paradigmático, como lo demuestra el curso monofásico y rápidamente progresivo de la enfermedad poco después de la infección y, generalmente, sin recaídas (47).

El diagnóstico es principalmente clínico, y las pruebas electrofisiológicas y el estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) se utilizan como criterios diagnósticos de apoyo. Hasta el momento, no se dispone de biomarcadores diagnósticos específicos para la mayoría de las variantes del síndrome (48,49). Las terapias eficaces en el SGB se limitan a plasmaféresis (50) y a inmunoglobulinas endovenosas (51). Ambos tratamientos han demostrado ser igual de eficaces para mejorar los resultados de la enfermedad, pero su efecto es limitado y, a menudo, la enfermedad sigue empeorando y aparece un daño nervioso permanente a pesar del tratamiento temprano (52). Aunque la mayoría de los pacientes mejoran significativamente, el pronóstico puede seguir siendo malo, con una discapacidad grave o incluso la muerte en hasta el 5-17% de los pacientes con SGB. Además, proporciones

significativas de pacientes muestran discapacidad en forma de fatiga o dolor a largo plazo y hasta un 21-38% de los pacientes no pueden caminar sin ayuda 6 meses después de la aparición del SGB (53).

El curso clínico y el pronóstico de la enfermedad son muy variables y se necesita un reconocimiento temprano de los pacientes con mal pronóstico para personalizar y mejorar el tratamiento y el seguimiento. Algunas de las características que se relacionan con un mal pronóstico en el SGB son la edad avanzada, la diarrea precedente (o la infección por *C jejuni* en las últimas 4 semanas) y la elevada discapacidad al inicio de la enfermedad (medida mediante la escala GDS, por sus siglas en inglés *GBS disability score*) (54).

Recientemente, el estudio IGOS (*International Guillain-Barré Syndrome Outcome Study*) ha permitido mejorar el conocimiento global sobre el SGB. Se trata de un estudio de cohortes multicéntrico, prospectivo y observacional que investiga los factores que determinan y predicen el curso clínico, el subtipo y el pronóstico del SGB (53); incluyendo a pacientes que cumplen los criterios diagnósticos del *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) o el síndrome de Miller Fisher (SMF) y otras variantes del SGB (55).

1.2.1.1 Variantes clínicas y electrofisiológicas del SGB

Se han descrito varias formas clínicas y electrofisiológicas con diferentes pronósticos dentro del síndrome de SGB. Éstos se distinguen por su presentación clínica, su electrofisiología, su patología y una fisiopatología subyacente distinta, si bien, existe una superposición significativa entre variantes y fenotipos, lo que sugiere que se trata de un espectro de trastornos en los que las diversas características clínicas, paraclínicas y electrofisiológicas no son exclusivas de cada una de las variantes.

Los subtipos más comunes del SGB son la polineuropatía inflamatoria desmielinizante aguda (**AIDP**) y la neuropatía axonal motora aguda (**AMAN**) (44). La AIDP es una forma sensitivo-motora del SGB que suele ir acompañada de déficits en los nervios craneales, disfunción autonómica y dolor radicular. Por el contrario, la AMAN es una forma motora pura del SGB, en la que la polineuropatía no se acompaña de déficits sensitivos (56). En la

AIDP, la lesión inmunitaria tiene lugar específicamente en la vaina de mielina y en componentes de las células de Schwann, mientras que en la AMAN las membranas axonales del nervio son el objetivo principal de la lesión inmunitaria. La clasificación en AMAN o AIDP se basa en estudios electrofisiológicos y patológicos, y se apoya en la identificación de anticuerpos específicos dirigidos contra los gangliósidos de la membrana neuronal (especialmente GM1 y GD1a) que aparecen de forma más frecuente, aunque no exclusiva, en la variante AMAN (46).

Otros síndromes clínicos, como el **síndrome de Miller Fisher** (SMF), aunque diferentes en su presentación clínica, se consideran fisiopatológicamente dentro del espectro del SGB. Los pacientes con SMF presentan la tríada clínica de oftalmoplejía bilateral, disminución de reflejos y ataxia (52). La **encefalitis de Bickerstaff** es una variante del SMF en la que aparece afectación central con alteración del nivel de conciencia y lesiones de aspecto inflamatorio en el tronco del encéfalo (57).

El SMF y sus variantes se caracterizan por presentar con una frecuencia muy elevada (90-95%) anticuerpos IgG contra los gangliósidos GQ1b, siendo la correlación clínico-inmunológica más sólida de las neuropatías autoinmunes. En muchas ocasiones, esta reactividad se acompaña de reactividad contra el gangliósido GT1a, que comparte un epítipo común con GQ1b (NeuNAcNeuNAcGal) (58).

Otros subtipos de SGB incluyen la neuropatía axonal sensitivo-motora aguda (**AMSAN**), que se manifiesta de forma similar a la AMAN pero con una afectación sensitiva más pronunciada (59); la **variante faringo-cervical-braquial**, que se manifiesta con una debilidad orofaríngea y cervicobraquial rápidamente progresiva asociada a una arreflexia de los miembros superiores (60); o la **variante paraparética** (61).

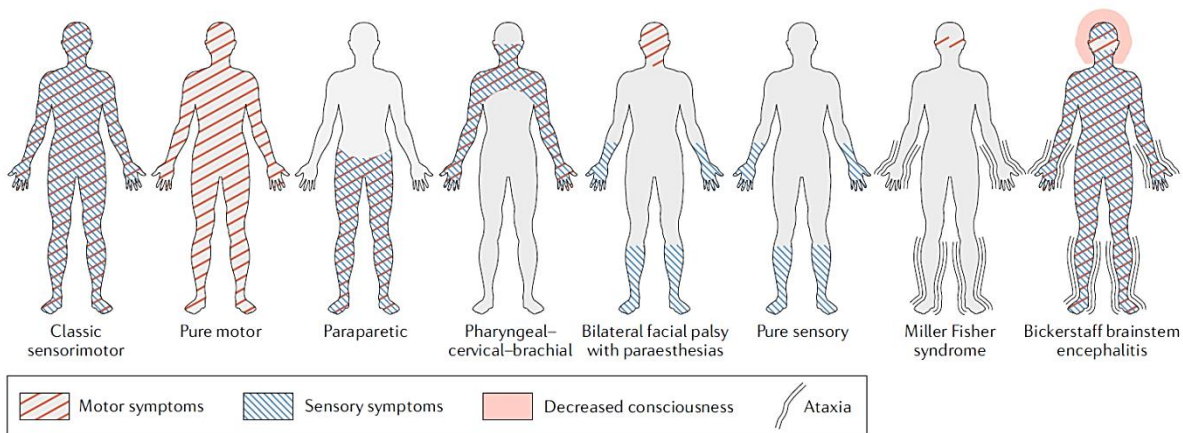


Figura 5. I Patrón de síntomas en las variantes del síndrome de Guillain-Barré. Representación gráfica del patrón de síntomas típicamente observados en las diferentes variantes clínicas del SGB. Adaptada de Leonhard 2019 (44).

1.2.1.2 Fisiopatología del SGB

El SGB se considera un trastorno autoinmune postinfeccioso de los nervios periféricos y las raíces nerviosas, caracterizado por una infiltración leucocitaria de los nervios que provoca desmielinización y pérdida axonal (62). En la mayoría de los pacientes, la aparición aguda de los síntomas neurológicos está precedida por un evento infeccioso desencadenante, seguido de una debilidad progresiva de las extremidades y arreflexia, que puede progresar durante 4 semanas antes de alcanzar la estabilidad clínica (49).

En la patogénesis del SGB se han implicado diversos mecanismos, como las respuestas inmunitarias humorales y celulares, los autoanticuerpos y el complemento, los macrófagos y los linfocitos activados. Sin embargo, el papel exacto y la secuencia temporal en la que aparecen estos mecanismos inmunopatogénicos siguen siendo relativamente desconocidos (35).

1.2.1.2.1 Histopatología del SGB

El conocimiento actual de la inmunopatogénesis del SGB está basado en los limitados datos patológicos (que se remontan en su mayoría a décadas atrás) y en el modelo animal de neuritis experimental autoinmune (EAN).

Los estudios de Haymaker y Kernohan describieron que el primer evento patológico en el SGB es la aparición de un edema endoneural en los nervios espinales, particularmente donde las ramas ventrales y dorsales se unen para formar los nervios periféricos. Se ha propuesto que este edema se asocia con la inexcitabilidad temprana de los nervios motores debido a la isquemia nerviosa proximal en los casos de SGB fulminante (63). Después de esta fase inicial, a partir del día 9, aparecen infiltrados inflamatorios, incluyendo macrófagos (64). Estas observaciones sugieren que los mecanismos efectores humorales son los que impulsan el inicio de la enfermedad, seguidos de los mecanismos efectores celulares que contribuyen al daño y la reparación del nervio.

Estudios *post-mortem* en biopsias de nervio sural descubrieron que la lesión patológica en la variante **AIDP** tiene lugar en la vaina de mielina, y demostraron la presencia de infiltrados de células T y macrófagos, responsables de la desmielinización (65). Además, se detectó la deposición de productos del complemento en las células de Schwann, lo que sugiere una lesión nerviosa mediada por anticuerpos (66).

Algunas de estas características histopatológicas pueden reproducirse en el modelo murino EAN, que se consigue mediante la inmunización con proteínas de mielina (PMP22, P0 o P2), galactocerebrósidos o mediante la transferencia de células T específicas contra P0 y P2, lo que da lugar a una enfermedad monofásica que se asemeja al SGB (67–69). De hecho, el sello patológico de la EAN es la infiltración del SNP por linfocitos y macrófagos, lo que da lugar a una desmielinización multifocal de los axones, predominantemente alrededor de los vasos. Los macrófagos separan activamente las láminas de mielina de los axones, inducen la disrupción vesicular de la vaina de mielina y fagocitan tanto la mielina intacta como la dañada (15).

Por el contrario, en los pacientes con **AMAN** el axolema es el objetivo principal de la lesión, y los estudios histológicos de los nervios muestran una lesión axonal primaria sin presencia de células T o desmielinización. La IgG y el complemento activado se depositan en el axolema nodal e internodal (70). Los macrófagos parecen invadir el espacio periaxonal, y hay un alargamiento nodal tras el desprendimiento de la mielina paranodal, lo que lleva a una ralentización de la conducción (71). Se ha descrito que la secuencia cronológica de la lesión en los pacientes con AMAN sería la siguiente: en la etapa

temprana hay un ataque inmune al nodo de Ranvier con destrucción de los canales de sodio-voltaje dependientes (Nav) y fallo en la conducción nerviosa; si el ataque progresa, el calcio entra en los axones y la activación de las proteasas induce daño axonal y degeneración (72,73).

La inmunización de conejos con gangliósidos GM1 puede producir una enfermedad que se asemeja a la variante AMAN: con anticuerpos circulantes anti-GM1, neuropatía motora y hallazgos patológicos como depósito de IgG en los axones motores o la presencia de macrófagos periaxoniales (74).

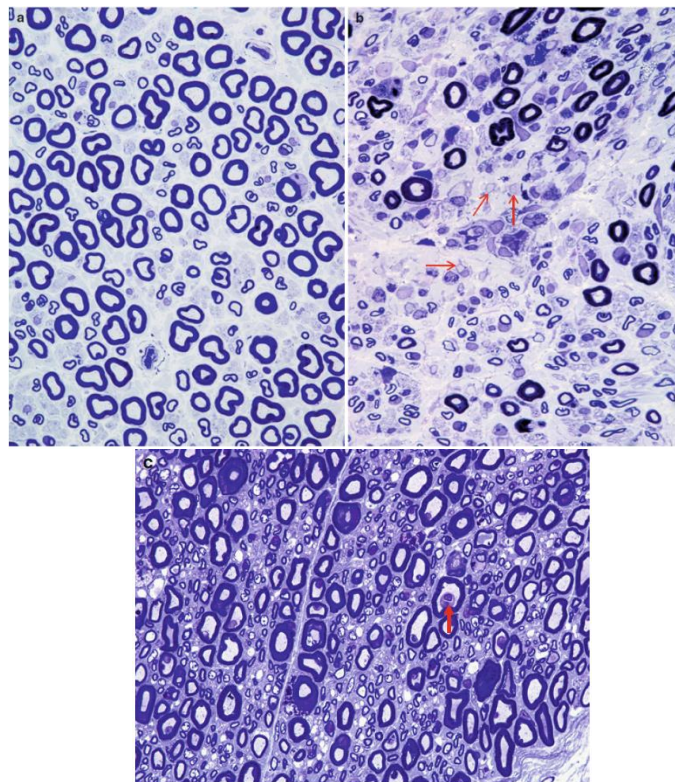


Figura 6. Nervio sural normal (a) comparado con el aspecto típico del nervio de un paciente con AIDP (b) o con AMAN (c). En el nervio de AIDP se observa un gran número de células alargadas e irregulares en el endoneuro, y la ruptura de la mielina con numerosos axones sin cubierta (flechas, b). En la sección del nervio de AMAN, se observan macrófagos dentro de vainas de mielina intactas adyacentes a axones intactos (flecha, c). Adaptada de Bilbao 2015 (4).

Los hallazgos en la patología de la AIDP y la AMAN complementan las descripciones iniciales de Haymaker y Kernohan, ya que la deposición de anticuerpos y la activación del complemento pueden ser los impulsores del edema inicial, seguido después por la infiltración de células T y macrófagos, pero aún quedan importantes lagunas por dilucidar. La escasez de muestras de biopsia y necropsia de pacientes con SGB dificultan los estudios inmunopatológicos; los estudios futuros deberían tratar de abordar los lugares de lesión y las características moleculares de la inmunopatología del SGB o encontrar marcadores sustitutos (de imagen, neurofisiológicos o biomarcadores solubles) que ayuden a dilucidar la inmunopatología del SGB (75–77).

1.2.1.2.2 Inmunidad humoral y mímica molecular

En aproximadamente dos tercios de los pacientes con SGB la enfermedad comienza con un evento infeccioso que ocurre hasta 4 semanas antes del inicio de la enfermedad (78). Seis patógenos principales se han asociado con el SGB en estudios de casos y controles: *Campylobacter jejuni*, citomegalovirus, virus de la hepatitis E, *Mycoplasma pneumoniae*, virus de Epstein-Barr y virus Zika; en el que nos centraremos en la segunda parte de este estudio (44,79–81). Recientemente, se han publicado casos de SGB en asociación con la infección por SARS-Cov-2, aunque no se ha demostrado una relación causal (82). También se han notificado casos de SGB poco después de la vacunación contra el virus de la gripe (83).

Esta relación directa entre la aparición de SGB y una infección previa apoyó el papel del mimetismo molecular entre antígenos del agente infeccioso y el nervio periférico como motor de la autoinmunidad en el SGB (35,84). Según este modelo, la respuesta inmunitaria dirigida a una infección conduce a la aparición de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con los gangliósidos del nervio periférico y de la raíz nerviosa, lo que desencadena una inflamación postinfecciosa que provoca daños en el nervio o bloqueos funcionales de la conducción nerviosa (85,86).

La hipótesis del mimetismo molecular se ha demostrado en el caso de *Campylobacter jejuni* y la variante AMAN del SGB: varios estudios de casos y controles han demostrado que aproximadamente el 26% de los pacientes con SGB (frente al 2% de los controles)

habían sufrido una infección previa por *C. jejuni*, estableciendo un vínculo epidemiológico (87); se observó que los pacientes con AMAN post-infección por *C. jejuni* tenían anticuerpos anti-GM1 y anti-GD1a (88); se detectaron similitudes estructurales entre los lipooligosacáridos (LOS) de las cepas de *C. jejuni* asociadas a la neuropatía y los gangliósidos de los nervios periféricos (89); y la sensibilización de animales con GM1 y LOS de *C. jejuni* dio lugar a las características clínicas de la variante AMAN (74).

En resumen, los anticuerpos dirigidos a los LOS de la pared bacteriana de *C. jejuni* reaccionan de forma cruzada con el gangliósido GM1 del nervio (21). Entonces, la deposición de autoanticuerpos anti-GM1 en el axolema nodal de las fibras motoras da lugar a la activación de la cascada del complemento, lo que conduce a un daño axonal (70).

Aunque entre el 30 y el 66% de los pacientes con AMAN sufren una infección previa por *C. jejuni*, se estima que menos de 1 de cada 1.000 individuos con una infección sintomática por *C. jejuni* desarrollan posteriormente AMAN. Esto puede ser debido a una combinación de factores del huésped y microbianos que determinan la producción de anticuerpos anti-gangliósido. Uno de los factores microbianos implicados es la sialilación de los LOS, que viene determinada por la presencia de polimorfismos genéticos que se encuentran sólo en ciertas cepas de *C. jejuni*. Aun así, la infección con una de estas cepas no siempre conduce al SGB, por lo que también hay otros factores implicados en el desarrollo de la enfermedad (90).

La deposición del complemento también se ha demostrado en la variante AIDP del SGB (66). A pesar de que no se han encontrado asociaciones claras de autoanticuerpos en este subconjunto de pacientes, se ha postulado que la unión de autoanticuerpos desconocidos dirigidos a epítomos de las células de Schwann podría determinar la activación del complemento y conducir a la aparición de inflamación y desmielinización.

1.2.1.2.2.1 Anticuerpos antigangliósidos

Los gangliósidos son glicolípidos que contienen ácido siálico y que se encuentran en el sistema nervioso de los mamíferos, especialmente en los nodos de Ranvier y en los terminales nerviosos motores (91). Los anticuerpos antigangliósido son el marcador

autoinmune más comúnmente reconocido en el SGB: pueden encontrarse en aproximadamente la mitad de los pacientes en la fase aguda del SGB (59). Como se ha descrito anteriormente, estos autoanticuerpos surgen por mimetismo molecular microbiano (92). Los anticuerpos anti-GM1 y anti-GQ1b, asociados a las variantes AMAN (93) y Miller Fisher (45) respectivamente, son los más relevantes clínicamente, pero también se han identificado muchos otros gangliósidos como dianas de anticuerpos (figura 7) (91).

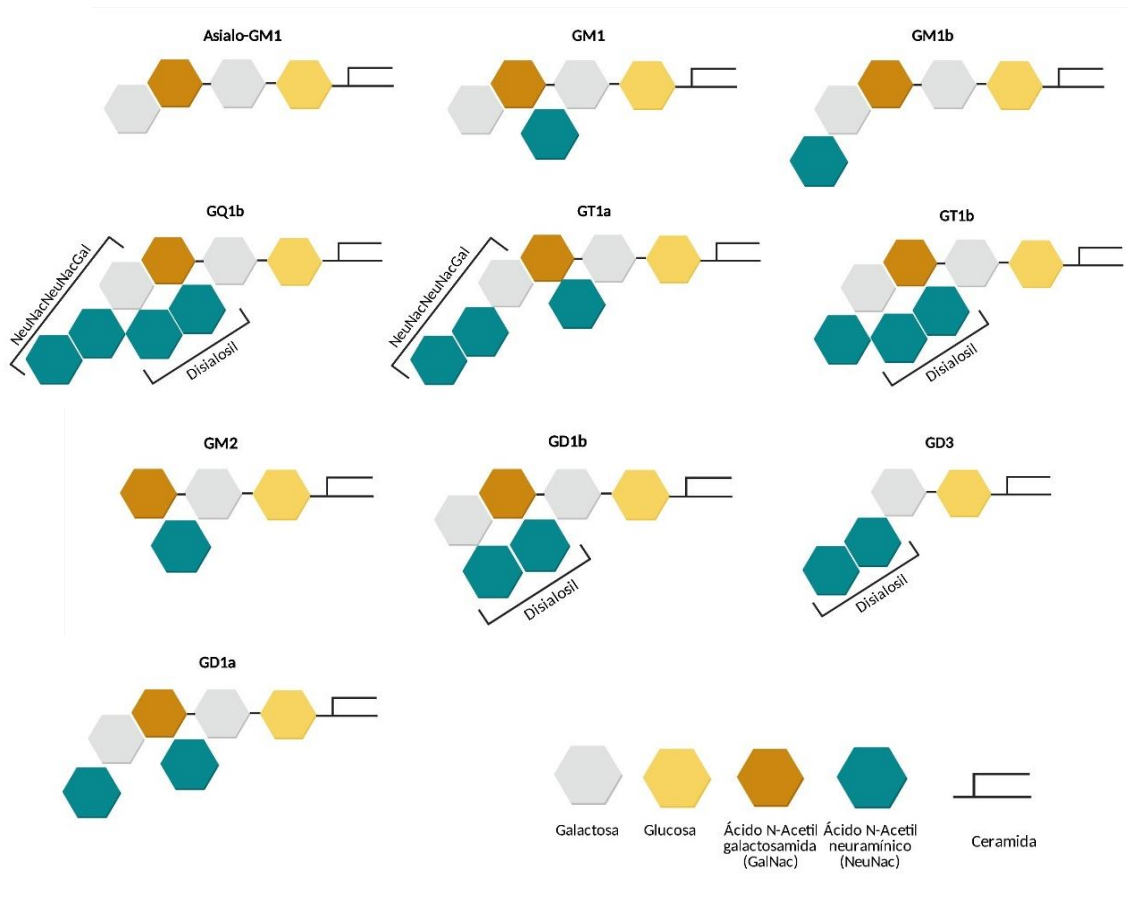


Figura 7. Gangliósidos. Creada con BioRender y adaptada de Kieseier 2018(20).

La distribución de los gangliósidos en el nervio influye en el fenotipo clínico del SGB. Por ejemplo, el GM1 y el GD1a se expresan predominantemente en el axolema de los nervios motores, particularmente en el nodo de Ranvier, y los anticuerpos anti-GM1 y anti-GD1a se asocian con fenotipos motores. El GQ1b está enriquecido en los nervios craneales que

inervan los músculos extraoculares, lo que da lugar a la oftalmoplejia observada en pacientes con SMF (94).

Algunos estudios en modelos animales y en biopsias de nervio han demostrado el papel patogénico de los anticuerpos antigangliósidos en el SGB. Los anticuerpos anti-GM1 y anti-GD1a se unen a los nodos de Ranvier y activan el complemento, lo que provoca la destrucción de los canales de sodio, el desprendimiento de la mielina paranodal y el alargamiento de los nodos (74,95,96). El efecto de estos anticuerpos está mediado en gran medida por la fijación del complemento, lo que da lugar a la formación del complejo de ataque a la membrana, aunque también se ha demostrado que la activación de los receptores Fcγ en los macrófagos infiltrados por los complejos anticuerpo-antígeno desempeña un papel en la activación de los macrófagos, la liberación de mediadores tóxicos adicionales y la fagocitosis de la mielina (97).

Del mismo modo, se ha observado *in vitro* que los anticuerpos anti-disialosil (que se unen a un epítipo presente en algunos gangliósidos, incluidos GD1b, GD3, GT1b y GQ1b) se unen al axolema nodal, lo que provoca una degeneración axonal dependiente de complemento o una inhibición de la mielinización independiente de complemento (98).

Variante de SGB	Anticuerpos anti-gangliósido asociados
Polineuropatía aguda inflamatoria desmielinizante (AIDP)	ninguno
Neuropatía axonal motora aguda (AMAN)	Anti-GM1, anti-GD1a
Neuropatía axonal sensitivo-motora aguda (AMSAN)	Anti-GM1, anti-GD1a
SGB sensitivo	Anti-GD1b
Neuropatía sensitivo-atáxica aguda (ASAN)	Anti-disialosil
Síndrome de Miller-Fisher (SMF)	Anti-GQ1b, anti-GT1a
Encefalitis de Bickerstaff	Anti-GQ1b, anti-GT1a
Parálisis faringo-cérvico-braquial	Anti-GT1a

Tabla 2. Anticuerpos anti-gangliósido asociados a las diferentes variantes del síndrome de Guillain-Barré.

1.2.1.2.2.2 Anticuerpos contra proteínas nodales y paranodales

Al igual que ocurre en la CIDP, un pequeño subgrupo de pacientes que cumplen criterios diagnósticos de SGB se asocian con anticuerpos contra proteínas del nodo y el paranodo de Ranvier (NF140/NF186 (99), NF155 (100), CASPR1 (101–103) y CNTN1 (102)). La mayoría estos pacientes tienen presentaciones agresivas y responden mal a las terapias convencionales del SGB; aunque en algunos casos la enfermedad permanece monofásica y los pacientes responden a inmunoglobulinas endovenosas.

En el primer estudio describiendo la presencia de anticuerpos anti-neurofascina en pacientes con SGB, los autores observaron 1 paciente con anticuerpos IgG1 anti-NF155, 1 con anticuerpos IgG1 anti-NF186, y otro con anticuerpos IgG1 e IgG3 contra las dos proteínas. Los tres pacientes presentaban la variante AIDP, habían sufrido una infección respiratoria previa y ninguno de ellos tenía anticuerpos antigangliósidos (100). En otro estudio con sueros se encontró un paciente con SGB con anticuerpos IgG3 anti-pan-NF (contra un epítipo común en las neurofascinas nodal y paranodal), que presentaba tetraplejía y afectación de los nervios craneales (104).

La reactividad contra la proteína paranodal CASPR1 podría estar también implicada en las neuropatías autoinmunes agudas. Esta observación surgió de la descripción de un paciente con cuadro clínico de SGB, dolor neuropático severo y anticuerpos IgG3 anti CASPR1 (105). Además, los mismos autores observaron posteriormente dos pacientes más con SGB y anticuerpos anti-paranodales: un paciente tenía anticuerpos IgG3 anti-CASPR1, y otro presentaba anticuerpos IgG2 reaccionando contra las proteínas CNTN1 y CASPR1 por separado. En este caso, los dos pacientes seropositivos eran mujeres de mediana edad que presentaban una grave afectación motora y una leve afectación sensitiva (102).

1.2.1.2.2.3 Otros autoanticuerpos

Mientras que las variantes AMAN y Síndrome de Miller Fisher se asocian a anticuerpos antigangliósidos específicos, las dianas del ataque inmunitario en la AIDP siguen siendo desconocidas. Algunos datos sugieren que la respuesta de autoanticuerpos en la AIDP se dirige hacia antígenos de superficie de las células de Schwann. De hecho, en biopsias de

nervio sural de 3 pacientes con AIDP se ha observado la deposición de complemento C3d y C5b-9 en la superficie externa de las células de Schwann, pero no en la mielina compacta. Estudios en sueros de pacientes con AIDP mostraron que un porcentaje significativo de ellos (alrededor del 25%) presentaba reactividad IgG o IgM contra la mielina, y que los patrones de tinción en las células de Schwann eran diversos, lo que sugiere que los autoanticuerpos reconocen una variedad de antígenos de la mielina, aún por descubrir (106,107). Además, en otros estudios se observó que el 44% de los sueros de los pacientes con AIDP se unían a regiones nodales o paranodales, lo que sugiere la presencia de dianas aún no identificadas en estas estructuras (99).

También se han descrito otros autoanticuerpos contra proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*), moesina, o tubulina, entre otros, pero no se ha dilucidado aún su relevancia inmunológica y clínica (108–110).

1.2.1.3 Síndrome de Guillain-Barré post-infección por virus Zika

1.2.1.3.1 Virus Zika: estructura y transmisión

El virus del Zika (ZIKV) es un arbovirus transmitido por mosquitos que, en humanos, suele dar lugar a infecciones asintomáticas o ligeramente sintomáticas (111). Fue descubierto por primera vez en el bosque Zika de Uganda en 1947, pero los anticuerpos contra el virus no fueron detectados en humanos hasta 1964 (112,113).

El ZIKV pertenece a la familia de los flavivirus (como el virus dengue) y su genoma es una molécula de ARN monocatenario de unos 11 kb que contiene dos regiones no codificantes en los extremos 5' y 3' y un único marco de lectura abierto, que codifica tres proteínas estructurales (cápside (C), envoltura (E), precursor de membrana (prM)) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (114).

El ZIKV es transmitido a los humanos mediante la picadura de hembras infectadas de diferentes especies *Aedes* de mosquitos (las más comunes son *A. aegypti* y *A. albopictus*). Estas dos especies de mosquitos generan un alto riesgo epidémico debido a su dinámica adaptación a los entornos urbanos y su capacidad para sobrevivir a condiciones ambientales

extremas. Otras vías de transmisión descritas en humanos incluyen la transmisión sexual y la transmisión perinatal de la madre al feto (115).

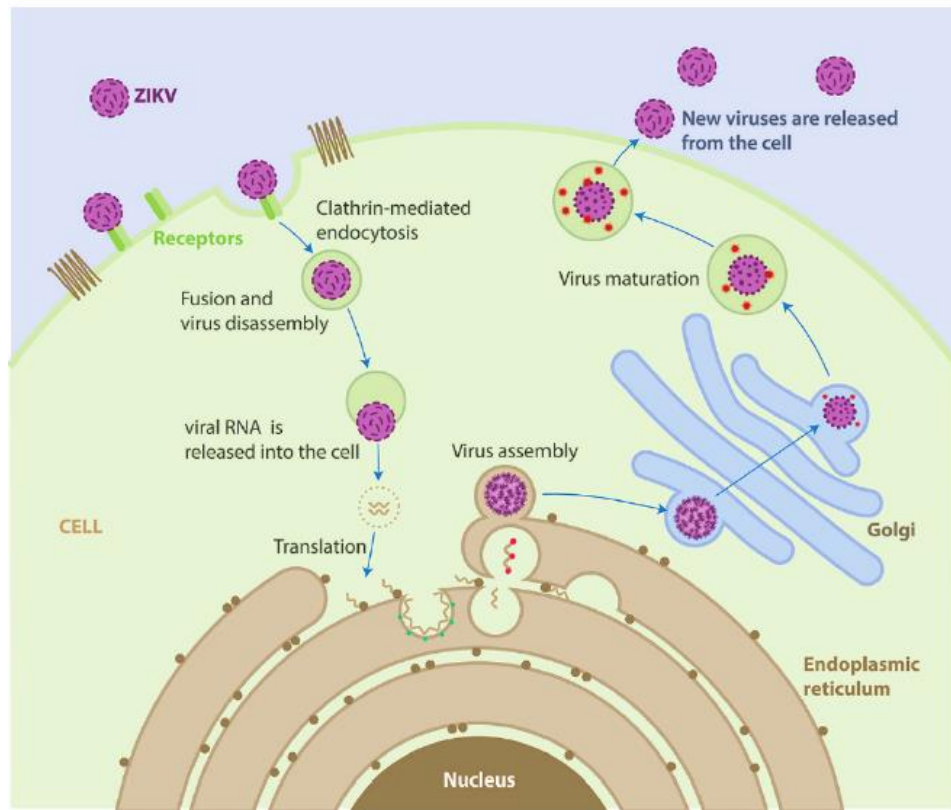


Figura 8. Ciclo de vida del ZIKV. El ZIKV se adhiere a la superficie de una célula huésped y entra en ella mediante endocitosis. Una vez dentro de la célula, el virus se fusiona con la membrana endosomal y se libera en el citoplasma, donde a su vez se libera el genoma viral. El ARN viral se traduce en un único polipéptido que se corta en 10 proteínas, y el genoma viral se replica. El ensamblaje del virus se produce en la superficie del retículo endoplásmico. Las partículas virales inmaduras son transportadas a través de la red trans-Golgi, donde maduran y se convierten en su forma infecciosa. Los virus maduros son liberados de la célula y pueden pasar a infectar otras células. Adaptada de Acosta-Ampudia 2018 (115)

La infección por el ZIKV se ha descrito como sintomática en el 18-57% de los casos, por lo que puede ser asintomática hasta en el 80% de los casos. Causa una enfermedad menor autolimitada con un periodo de incubación de un máximo de 10 días. Los pacientes sintomáticos pueden desarrollar fiebre y síntomas típicos de las infecciones arbovirales,

como erupción cutánea, dolor articular, conjuntivitis, dolor de cabeza y mialgias. Sin embargo, su infección se ha relacionado con numerosas complicaciones neurológicas, como anomalías cerebrales congénitas, microcefalia infantil, síndrome de Guillain-Barré y meningoencefalitis; tal y como describiremos más adelante (115).

1.2.1.3.2 Historia y epidemiología

En 2007, en el estado de Yap de los Estados Federados de Micronesia se produjo el primer brote conocido de infección por el ZIKV, que afectó al 73% de la población local, con una estimación de 900 casos notificados. En ese momento, la enfermedad era autolimitada y se caracterizaba por fiebre, erupción cutánea, conjuntivitis y artralgia, sin que se describieran complicaciones neurológicas importantes (116).

A medida que el ZIKV continuó extendiéndose por las regiones del Pacífico en 2013 y 2014, se describió una relación temporal entre el brote de infección por el ZIKV y un mayor número de casos de SGB y otros trastornos neurológicos en la Polinesia Francesa. El primer caso reportado de SGB post-infección por el virus Zika (ZIKV-SGB) fue en diciembre de 2013 (117). Un estudio demostró mediante pruebas serológicas que 41 de los 42 pacientes con SGB que hubo durante 2013 y 2014 en la región afectada tenían evidencia de una infección reciente por el virus (79).

En 2015, la pandemia del ZIKV llegó a Sudamérica, donde se extendió rápidamente (118). En abril de 2016, un total de 13 países afectados habían notificado un aumento de la incidencia del SGB, las estimaciones de riesgo global oscilaron entre 1 y 8 casos de SGB por cada 10.000 infecciones (119). En comparación con la época anterior a la aparición del ZIKV, la incidencia del SGB se multiplicó por 5.1 en Río de Janeiro (Brasil), por 2.7 en el estado de Bahía (Brasil), por 3.1 en Colombia, por 2.5 en la República Dominicana, por 2 en El Salvador, por 2.4 en Honduras, por 5 en Surinam y por 9.8 en Venezuela (120). También se observó la aparición de otros trastornos neurológicos autoinmunes, como encefalitis y mielitis, vinculados a la infección por el ZIKV (121).

La asociación entre la infección y las complicaciones neurológicas; en especial la asociación entre la infección en mujeres gestantes y los casos de microcefalia y otras

anomalías en los recién nacidos, que se notificó por primera vez en 2015 en Brasil, provocó que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarase la epidemia del Zika como emergencia de salud pública de interés internacional en febrero de 2016 (122).

1.2.1.3.3 Caracterización de los pacientes afectados por ZIKV-SGB

El ZIKV-SGB parece ocurrir con más frecuencia en adultos jóvenes y es ligeramente más prevalente en hombres. Las edades medias fueron de 47, 42 y 42 años en las cohortes de Colombia, la Polinesia Francesa y Brasil, respectivamente. La tasa de mortalidad fue entre 0 y 4%, y en general el pronóstico fue similar al que tienen los pacientes con SGB por otras causas (79,123,124).

Aunque el perfil clínico del SGB-ZIKV sigue la presentación clásica del SGB, en algunas cohortes se observaron algunos casos de síndrome de Miller-Fisher, de encefalitis de Bickerstaff y de variante faringo-cérvico-braquial. Una de las observaciones más interesantes en el SGB-ZIKV es la rápida presentación de los síntomas neurológicos: estos se presentaron entre 6 y 10 días de media después de los síntomas iniciales de la infección por el ZIKV en todos los estudios (79,123,124). Esto difiere de la forma clásica de SGB, en la que los pacientes desarrollan síntomas neurológicos entre 2 y 4 semanas después de la infección (125).

Existen algunas controversias en algunas series de SGB-ZIKV en relación con el patrón electrofisiológico más comúnmente observado. Se consideró que casi todos los pacientes de una serie de casos de Cúcuta (Colombia) cumplían criterios de AMAN en estudios de conducción nerviosa [10 de 14 (73%) pacientes](126). En cambio, en otra serie colombiana más grande, que incluyó 46 pacientes, se consideró que 36 (78%) tenían AIDP, 1 paciente (2%) AMAN y 4 pacientes (9%) tenían estudios equívocos que no permitían una clasificación (123). En una cohorte brasileña, de los 27 de casos de SGB-ZIKV, 18 (66,6%) eran compatibles con AIDP, 2 (7,4%) tenían AMAN, 6 (22,2%) tenían AMSAN, y 1 (3,7%) fue diagnosticado como síndrome de Miller Fisher (124). En el estudio de la Polinesia Francesa, los 37 pacientes examinados fueron diagnosticados de AMAN (79); sin embargo, los estudios de seguimiento a los 4 meses fueron más sugestivos de desmielinización distal.

Analizando todos los datos electrofisiológicos publicados de las diferentes cohortes, se observa que el SGB-ZIKV es predominantemente desmielinizante, con una importante afectación de los nervios distales. Limitaciones de los estudios publicados incluyen la heterogeneidad de los criterios utilizados para la clasificación del subtipo y las diferencias técnicas en la adquisición de los datos neurofisiológicos (127). Otros autores sugieren que la variabilidad en los patrones electrofisiológicos en las diferentes poblaciones con ZIKV-SGB puede ser explicada en parte por diferencias en la distribución de los alelos de HLA y la respuesta inmunológica asociada. (128).

1.2.1.3.4 Fisiopatología del SGB por virus Zika

Aunque hay una clara evidencia de la asociación entre la infección por ZIKV y el SGB, todavía no se conocen los mecanismos involucrados en su patogénesis. Sin embargo, se han propuesto múltiples interacciones huésped-virus que podrían inducir la enfermedad. Algunas de ellas se centran en el mimetismo molecular, la potenciación dependiente de anticuerpos, la inmunoreactividad de las células T y el neurotropismo viral contra células neuronales y gliales (estos mecanismos están resumidos en la tabla 2) (129).

Se ha debatido si la aparición del SGB representa una etiología parainfecciosa o postinfecciosa. En algunos casos, el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas asociados al ZIKV y el desarrollo de las complicaciones neurológicas puede ser lo suficientemente largo para la producción de anticuerpos y sería compatible con el papel de una respuesta inmune adaptativa en este proceso (130). En cambio, en algunos pacientes con ZIKV-SGB la latencia entre la infección aguda y los síntomas neurológicos es demasiado corta para permitir una reacción autoinmune a una exposición viral primaria; lo que sugiere un perfil temporal parainfeccioso que podría ser explicado, por ejemplo, por la hipótesis de potenciación de los anticuerpos de reacción cruzada (125,128).

Clínicamente, el papel de los factores humorales en el ZIKV-SGB está respaldado por el efecto beneficioso del tratamiento con inmunoglobulinas endovenosas y plasmaféresis en estos pacientes (125).

Mecanismo inmunopatogénico		Explicación
Daño viral indirecto	Mímica molecular	Los anticuerpos inducidos por la infección pueden reaccionar de forma cruzada con estructuras de los nervios periféricos, debido a similitudes entre proteínas del ZIKV y proteínas neurales.
	Reactividad cruzada y potenciación mediada por anticuerpos	El ZIKV puede provocar una respuesta de memoria en sujetos que han estado expuestos previamente a otros flavivirus. Estos anticuerpos potencian la infección, dando lugar a manifestaciones y complicaciones más graves.
	Respuesta de las células T autorreactivas	Las células presentadoras de antígeno pueden mostrar péptidos derivados del ZIKV a los linfocitos T CD4+ <i>naive</i> , impulsando la activación de estas células y la inflamación, provocando el daño de los nervios periféricos.
Daño viral directo		La infección directa de células de Schwann y neuronas puede inducir cambios citopáticos causando citotoxicidad mediada por los linfocitos T CD8+.

Tabla 3. Resumen de los posibles mecanismos inmunopatogénicos implicados en el SGB post-infección por ZIKV.

1.2.1.3.4.1 Mímica molecular

Se ha hipotetizado que el SGB post-infección por el ZIKV podría ser debido a un mecanismo inmunopatogénico similar al observado en la infección por *Campilobacter jejuni*: los componentes antigénicos del ZIKV pueden tener homología con componentes del sistema nervioso periférico; por lo tanto, los anticuerpos neutralizantes creados contra el ZIKV se adhieren a los antígenos de los nervios periféricos, provocando la activación del sistema del complemento y desencadenando una inflamación local impulsada por macrófagos (129).

En un estudio realizado por Rivera-Correa y sus colaboradores observaron que los pacientes afectados de ZIKV-SGB presentan mayores niveles de anticuerpos anti-gangliósido en comparación con los pacientes con Zika sin complicaciones, sugiriendo que estos autoanticuerpos podrían ser un factor desencadenante del SGB en estos pacientes (131). Un estudio anterior realizado con muestras de pacientes del brote de la Polinesia

Francesa mostró también un aumento de anticuerpos antigangliósidos en el grupo ZIKV-SGB (79). Sin embargo, el análisis de la presencia de anticuerpos antigangliósidos en sueros de pacientes diagnosticados de ZIKV-SGB en Cúcuta (Colombia) demostró una menor frecuencia de dichos anticuerpos que en el grupo infectado por ZIKV sin complicaciones neurológicas (132). Además, una investigación más reciente con sueros obtenidos de pacientes con SGB durante el brote en el noreste de Brasil no encontró ningún patrón específico de anticuerpos anti-glicolípidos asociado a la enfermedad (133). Estos hallazgos sugieren que los antígenos implicados en el mimetismo molecular relacionado con el ZIKV podrían ser diferentes de los que suelen estar implicados en el SGB secundario a otras causas.

Se ha demostrado un alto solapamiento estructural entre la poliproteína del ZIKV y parte del proteoma humano: se observaron más de 500 epítodos inmunogénicos compartidos por el virus y proteínas humanas relacionadas con neuropatías axonales y trastornos de la mielina. Según estos análisis, la respuesta inmunitaria creada contra la infección por el ZIKV podría reaccionar de forma cruzada con algunas moléculas del sistema nervioso, contribuyendo así a las secuelas neuropatológicas asociadas al ZIKV (134).

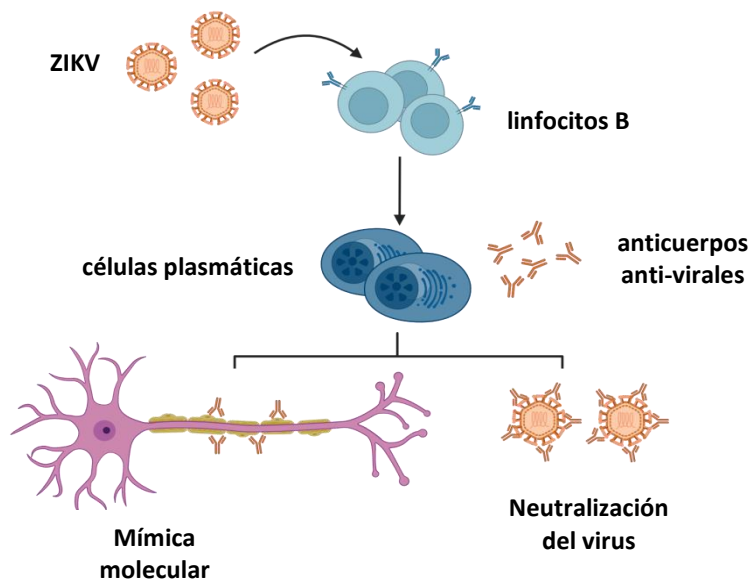


Figura 9. Mímica molecular entre ZIKV y componentes del sistema nervioso periférico. Adaptada de Muñoz 2016 (129) y creada con BioRender.

1.2.1.3.4.2 Reactividad cruzada y potenciación dependiente de anticuerpos

El ZIKV puede desencadenar una respuesta inmunitaria de memoria en sujetos que han estado expuestos previamente a otros flavivirus como el dengue (DENV). Los anticuerpos de reacción cruzada pueden impulsar la potenciación de la infección por el ZIKV, dando lugar a manifestaciones y complicaciones más graves (129,135).

A pesar de que la diferencia genética entre el ZIKV y el DENV es de aproximadamente un 40%, se ha demostrado una elevada reactividad cruzada de los anticuerpos neutralizantes entre ambos (136). En las regiones del mundo afectadas por los recientes brotes del ZIKV y en las que el DENV es endémico, la respuesta inmunológica de memoria contra el DENV puede potenciar la replicación del ZIKV mediante el mecanismo de potenciación dependiente de anticuerpos, lo que puede dar lugar a complicaciones como el SGB.

Los anticuerpos IgG contra la proteína E o la proteína prM producidos por una infección previa por otro flavivirus no neutralizan el ZIKV, sino que potencian la captura de estos complejos por parte de las células que expresan FcγR (por ejemplo, los macrófagos), lo que en última instancia aumenta la carga del ZIKV, promoviendo la enfermedad (125).

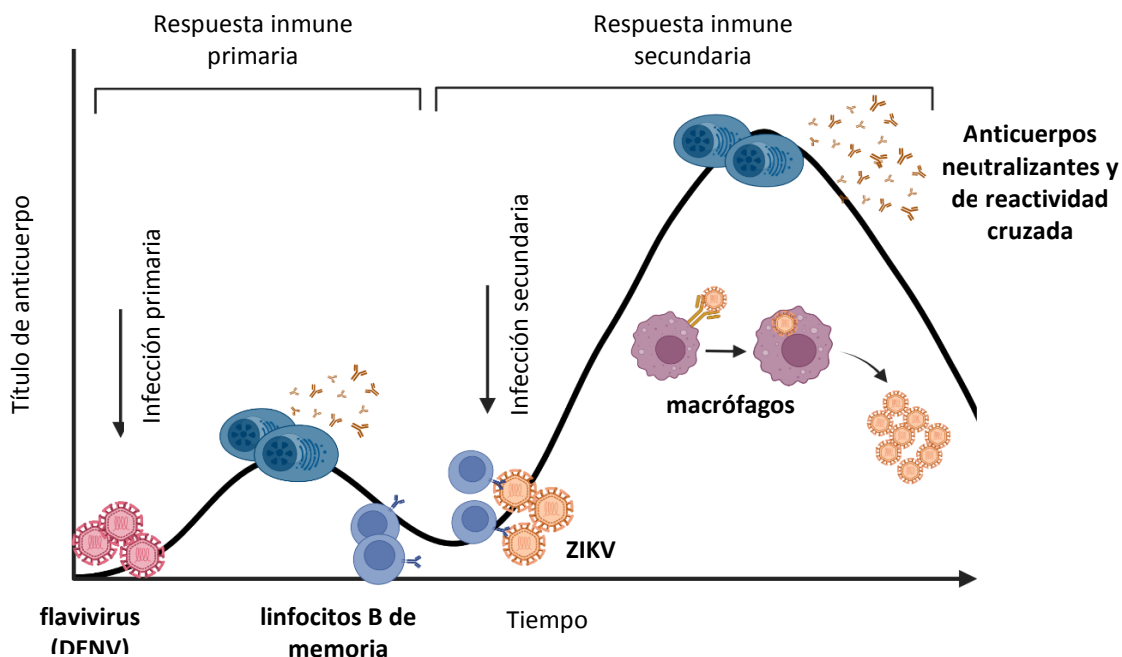


Figura 10. Reactividad cruzada y potenciación dependiente de anticuerpos. Adaptada de Muñoz 2016 (129) y creada con BioRender.

1.2.1.3.4.3 Respuesta de las células T autoreactivas

Otro mecanismo hipotético puede implicar la respuesta de las células T, que pueden dirigirse contra antígenos neuronales (axonales o de mielina). Esta hipótesis se deriva de la observación de infiltrados de células T perineurales en tejidos nerviosos de pacientes con SGB asociado a otros patógenos, que apoyan el papel de una inmunidad mediada por células (129). Del mismo modo, como se ha observado en el DENV, el ZIKV podría inducir una activación policlonal de linfocitos B que contribuya a una respuesta inmunitaria exacerbada (137).

Las células presentadoras de antígeno presentan péptidos derivados del ZIKV a los linfocitos T CD4+ *naive*, impulsando la activación de estas células y la inflamación. Las citocinas y otras células inflamatorias son atraídas al sistema nervioso periférico, mediando la lesión del nervio (125).

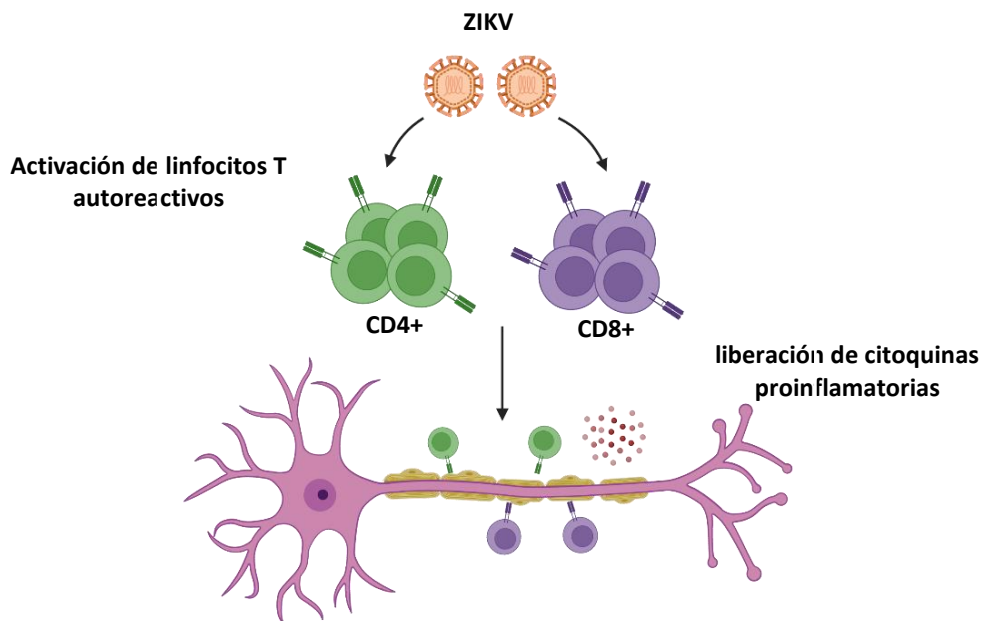


Figura 11. Respuesta de las células T autoreactivas. Adaptada de Muñoz 2016 (129) y creada con BioRender.

1.2.1.3.4.4 Daño viral directo

Además del efecto indirecto del ZIKV a través del sistema inmunitario en la patogénesis del ZIKV-SGB, también se ha propuesto un daño neurotrópico directo del sistema nervioso periférico. El efecto viral directo sobre neuronas o células gliales puede ser un posible mecanismo en casos de encefalitis, mielitis o SGB, aunque esta hipótesis se basa únicamente en observaciones en modelos animales y celulares.

Se ha observado en diferentes modelos que el ZIKV puede infectar directamente las neuronas periféricas e inducir su muerte (138,139). En 1952, Dick describió las propiedades patológicas del ZIKV y observó que mostraba un alto grado de neurotropismo en el cerebro de ratones jóvenes cuando se inoculaba directamente, causando la degeneración de las células neuronales, principalmente en el hipocampo (112). Posteriormente, Bell describió el impacto de la infección por el ZIKV en el cerebro de ratones en desarrollo, y observó que el virus infectó tanto a las neuronas como a los astrocitos (140).

Recientemente, modelos murinos de infección por el ZIKV durante el embarazo han apoyado aún más el neurotropismo. Los fetos de madres infectadas por el ZIKV han mostrado una infección en el cerebro que conduce a un síndrome similar a la restricción del crecimiento intrauterino y a la microcefalia (141). Otros experimentos *in vitro* con células humanas sugieren que el objetivo de la infección por el ZIKV son las células progenitoras neuronales en las que el virus induce la muerte celular y el deterioro del neurodesarrollo (142).

Sin embargo, hasta el momento no hay estudios experimentales que demuestren el neurotropismo del ZIKV en adultos (129). Además, Nascimento *et al* realizaron una biopsia del nervio sural fascicular en un paciente varón con ZIKV-SGB, que mostró predominantemente desmielinización de las fibras nerviosas y algunas fibras con degeneración axonal, asociada a la presencia de células inflamatorias mononucleares, consistente con los hallazgos clásicos del SGB. Las técnicas de RT-PCR no revelaron infección viral directa, sugiriendo un daño viral indirecto mediado por el sistema inmunitario (128).

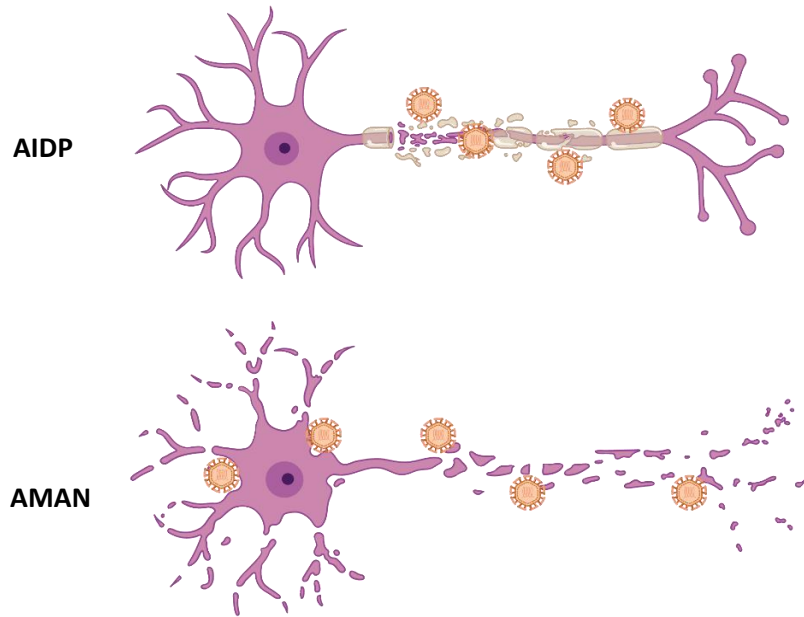


Figura 12. Daño viral directo. Adaptada de Muñoz 2016 (129) y creada con BioRender.

1.3 Relevancia de la detección de nuevos autoanticuerpos en el SGB

Tal y como se ha observado en algunas variantes del SGB y en otras neuropatías inflamatorias, la detección de nuevos autoanticuerpos tiene una aplicación directa en la práctica clínica, ya que son útiles en el diagnóstico, el pronóstico y la elección del tratamiento de estos pacientes, y nos ayudan a comprender los mecanismos inmunopatogénicos de la enfermedad. La descripción de autoanticuerpos dirigidos contra estructuras del nervio periférico como los gangliósidos o los anticuerpos contra proteínas del nodo y el paranodo de Ranvier ha supuesto un impulso en el campo de las neuropatías inmunomediadas, ya que ha permitido la identificación de subgrupos de pacientes con fenotipos clínicos específicos, demostrando así la existencia de distintos subtipos de enfermedad con dianas antigénicas y mecanismos inmunopatogénicos diferentes (35).

En el caso concreto del SGB, los antígenos diana siguen siendo desconocidos en una gran proporción de pacientes, especialmente de la variante AIDP. Teniendo en cuenta el amplio espectro clínico y epidemiológico del SGB, los diversos desencadenantes infecciosos, y los hallazgos histopatológicos en biopsias de pacientes (en los que se observan indicios de lesión nerviosa mediada por anticuerpos)(66) se puede hipotetizar que un amplio repertorio de autoanticuerpos dirigidos a diversos componentes nerviosos podría estar causando la patología nerviosa en estos pacientes.

Además, el mimetismo molecular observado entre algunos agentes infecciosos (como *C.jejuni*) y componentes del nervio periférico (como los gangliósidos GM1), que conlleva la existencia de un subgrupo de pacientes con anticuerpos anti-GM1 y un fenotipo predominantemente motor, sugiere que el SGB en pacientes que han sufrido infección por el virus Zika se podría desarrollar por un mecanismo de autoinmunidad postinfecciosa similar. De este modo, tratar de identificar nuevos autoanticuerpos en una cohorte homogénea desde el punto de vista de su antecedente infeccioso, puede disminuir la variabilidad y ayudar a la identificación de las estructuras neurales diana de esta autoinmunidad.

2. HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis general

El Síndrome de Guillain-Barré es una neuropatía inflamatoria aguda con una presentación y una patogénesis heterogéneas en cuya patogenia participa de manera central la inmunidad humoral. La identificación de autoanticuerpos en estos pacientes puede desembocar en el desarrollo de 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

- El SGB comprende diversas variantes caracterizadas por reactividades antigénicas diversas.
- Los antígenos diana de la mayor parte de pacientes con SGB no han sido identificados aún.
- El SGB en pacientes que han sufrido infección por virus Zika se desarrolla por un mecanismo de autoinmunidad.
- La aplicación de técnicas de cribado sistemático de autoanticuerpos permitirá identificar nuevos antígenos o estructuras neurales diana responsables de la respuesta inmunológica en el SGB.
- El cribado en una variante de SGB con un desencadenante homogéneo facilitará esta identificación de nuevos autoanticuerpos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar nuevos autoanticuerpos y patrones serológicos de reactividad sobre estructuras neurales en pacientes con Síndrome de Guillain-Barré para mejorar el conocimiento de su fisiopatología, su caracterización clínica, valoración de respuesta terapéutica y predicción del pronóstico a largo plazo.

3.2 Objetivos específicos

- Testar la reactividad de los pacientes con SGB contra antígenos previamente descritos: gangliósidos y proteínas del nodo y el paranodo de Ranvier.
- Realizar un cribado de nuevas reactividades antigénicas contra componentes del nervio periférico en una cohorte de SGB esporádico y una cohorte de SGB post-infección por el virus Zika.
- Identificar los potenciales antígenos responsables del SGB desencadenado por el virus Zika.
- Establecer correlaciones clínico-inmunológicas entre los patrones de reactividad detectados y las características clínico-epidemiológicas de los pacientes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Pacientes y recogida de datos

4.1.1 Pacientes con SGB esporádico

En este cribado se utilizaron muestras de suero de 100 pacientes con SGB incluidos en la cohorte española del *International GBS Outcome study* (IGOS)(143).

Los pacientes fueron reclutados entre febrero de 2013 y enero de 2020. Todos ellos cumplían criterios diagnósticos de SGB y se incluyeron en las dos semanas siguientes al inicio de la debilidad. En este estudio, se utilizaron las muestras de suero basales. En 62 pacientes, las muestras analizadas se recogieron antes de iniciar el tratamiento. Las muestras de suero se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Las variantes clínicas se definieron como sensitivo-motoras, motoras puras, sensitivas puras, síndrome de Miller Fisher (SMF) y atáxicas. Los resultados de los estudios de conducción nerviosa se clasificaron como polineuropatía inflamatoria aguda desmielinizante (AIDP), neuropatía axonal motora aguda (AMAN), neuropatía axonal motora-sensitiva aguda (AMSAN), estudio equívoco (alteraciones leves que no llegan a cumplir criterios de desmielinización adquirida propuestos por la EFNS/PNS) (144) o normal. La evolución de todos los pacientes con SGB a los 6 meses y al año del inicio de la enfermedad se evaluó mediante la escala GDS (por sus siglas en inglés *GBS disability score*), un sistema ampliamente aceptado para evaluar la capacidad funcional de los pacientes (tabla 3) (145). Los pacientes incapaces de caminar de forma independiente (≥ 3) a los 6 meses se definieron como con un mal resultado en este estudio.

Además, se incluyeron muestras de suero de un grupo de control (n=90) que incluía 45 controles sanos y 45 pacientes con otros trastornos neuromusculares: 23 pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y 22 con enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT).

GBS disability score (GDS)	
0	Ausencia de síntomas
1	Síntomas leves, capaz de correr
2	Capaz de caminar 10m o más sin ayuda/un apoyo, pero incapaz de correr
3	Capaz de caminar 10m con ayuda/un apoyo
4	Encamado o restringido a silla de ruedas
5	Necesidad de ventilación asistida
6	Muerte

Tabla 4. Escala usada para medir la discapacidad en los pacientes con SGB (*GBS disability score*)

4.1.2 Pacientes con ZIKV-SGB

Para realizar este estudio se recogieron muestras de suero de pacientes con antecedente de infección por virus Zika con y sin complicaciones neurológicas de dos cohortes de pacientes de diferentes regiones de Colombia: Cúcuta (n=118) y Barranquilla (n=11). Además, se obtuvieron muestras adicionales de sujetos sanos o con otras enfermedades neuromusculares.

En total, se analizaron muestras de 31 pacientes con SGB post-infección por virus Zika (ZIKV-SGB), 12 pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias post-infección por virus Zika (ZIKV-OEN), 77 pacientes con antecedente de infección por virus Zika sin ninguna complicación neurológica asociada (ZIKV-CON), 37 controles sanos, y 10 pacientes con otras enfermedades neuromusculares no inflamatorias (disferlinopatía o ELA) (figura 13). Las muestras de suero se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

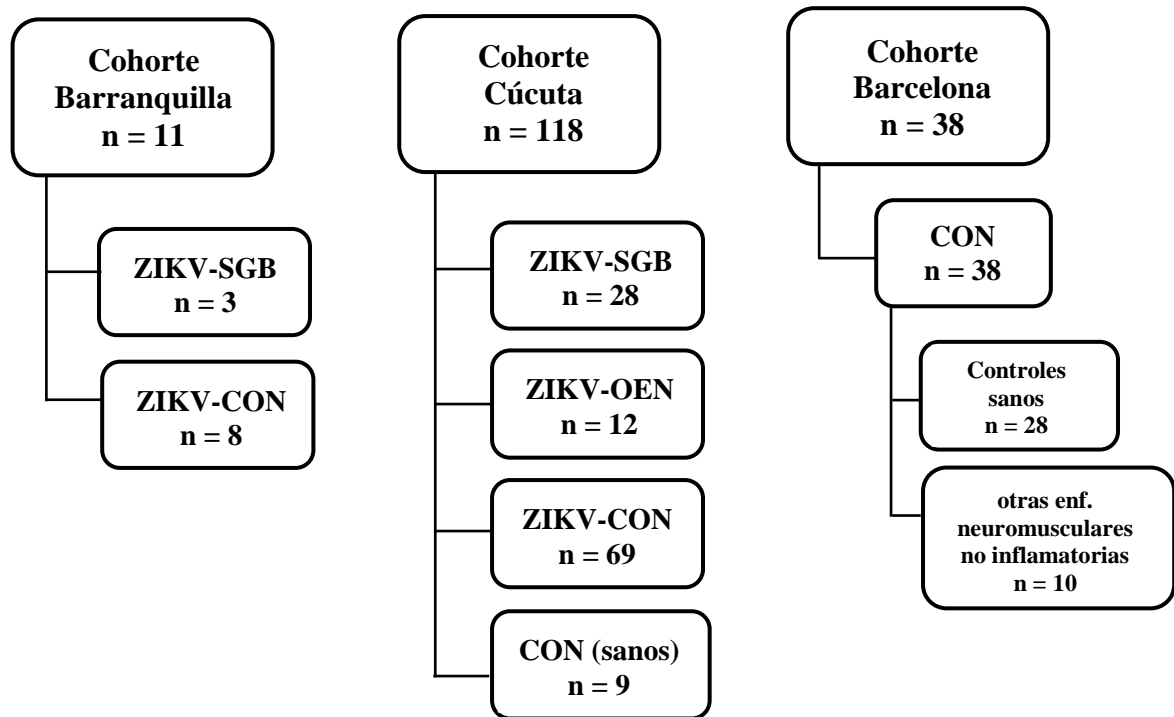


Figura 13. Diagrama ilustrando las diferentes cohortes de pacientes cuyas muestras fueron usadas en el estudio

4.2 Determinación de autoanticuerpos conocidos

4.2.1 Determinación de anticuerpos anti-nodo/paranodales

Los autoanticuerpos contra NF140, NF186, NF155, CNTN1 y CASPR1 se analizaron mediante ELISA.

Las placas ELISA Maxisorb de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, NUNC, Dinamarca) se recubrieron con 1 µg/ml de proteína recombinante humana CNTN1 (Sino Biological Inc., Georgia, EE.UU.), 1 µg/ml de proteína NF155 (Origene, Maryland, EE.UU.), 1 µg/ml de proteína NF140 (Sino Biological), 1 µg/ml de proteína NF186 (Origene) o 5 µg/ml de proteína CASPR1 (R&Dsystems, MI, EE.UU.); y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Los pocillos se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBS al 0,1% de Tween-20

durante 1 hora, se incubaron con sueros diluidos 1/100 en tampón de bloqueo durante 1 hora y, a continuación, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Invitrogen, CA, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente. El ELISA se reveló con una solución de tetrametilbencidina (TMB, Biolegend, California, EE.UU.), y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico al 25%. La densidad óptica se midió a 450 nm con el lector Multiscan ELISA. Los resultados se representaron como la diferencia de la densidad óptica (ΔDO) entre el pocillo con muestra y el pocillo blanco (no incubado con suero). Las muestras se consideraron positivas por ELISA cuando tenían una ΔOD superior a la media de los controles sanos más dos desviaciones estándar. Todas las muestras se analizaron en las mismas condiciones.

Los ensayos basados en células se utilizaron como segunda técnica de confirmación para los casos dudosos. Brevemente, se transfectaron vectores de expresión que codifican NF140, NF186, NF155, CNTN1 o CASPR1 humanos en células HEK293 utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y se bloquearon. Se realizaron experimentos de inmunocitoquímica utilizando sueros de pacientes y los anticuerpos primarios y secundarios adecuados (146). Los resultados fueron observados en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japón).

4.2.2 Determinación de anticuerpos anti-gangliósido

Los sueros de los pacientes se analizaron para detectar la presencia de anticuerpos antigangliósidos utilizando un protocolo ELISA previamente validado como método de detección general (147).

Las placas de ELISA Immulon de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) se recubrieron con los diferentes gangliósidos a analizar (GM1, GM2, GM3, GD1b, GD3, aGM1, GT1a, GT1b y GQ1b) diluidos en metanol, y se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas. Los pocillos se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS durante 2 horas a 4°C y se incubaron con los sueros diluidos en BSA al 0.1% en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incubaron los pocillos con anticuerpos secundarios anti-IgG o anti-IgM conjugados con peroxidasa durante 2 horas a 4°C. El ELISA se reveló con una

solución de OPD (Sigma), y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico al 25%. La densidad óptica se midió a 490 nm con el lector Multiscan ELISA.

Los resultados se representaron como la diferencia de la densidad óptica (ΔDO) entre el pocillo con muestra y el pocillo blanco (sin ningún gangliósido). Las muestras se consideraron positivas cuando tenían una ΔOD superior a 0.1 para GM1, GM2, GM3, GD1b, GD3, GT1a, GT1b y GQ1b; y superior a 0.2 para aGM1.

Los títulos de anticuerpos se obtuvieron mediante el testado de diferentes diluciones de sueros: 1/100, 1/500, 1/2500 y 1/12500. Los anticuerpos antigangliósido se consideraron positivos a un título mínimo de 1/1000.

4.3 Detección de nuevos autoanticuerpos contra estructuras nerviosas

4.3.1 ICC en neuronas murinas de ganglio raquídeo dorsal

Los GRD se diseccionaron a partir de embriones de rata E16, se disociaron y se colocaron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con laminina (Invitrogen) y poli-D-lisina (Sigma). Las células se cultivaron en medio neurobasal (Gibco BRL, NY, EE.UU.) complementado con B27 (Gibco), Glutamax (Gibco) y factor de crecimiento nervioso (NGF) (Invitrogen). Tras 24 horas, se añadió al medio arabinósido de citosina (ARA-C) (Sigma) y fluorouracilo (5-FU) (Sigma) para eliminar los fibroblastos. A continuación, se sustituyó el medio cada dos días hasta alcanzar el crecimiento y la diferenciación completos de las neuronas.

Las neuronas vivas se incubaron durante 1 hora con sueros de pacientes diluidos 1/100 (para experimentos con IgG) o 1/40 (para experimentos con IgM) en medio de cultivo a 37°C. A continuación, las células se fijaron durante 10 minutos con PFA al 4% y se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG o IgM humana (Molecular probes, Oregón, EE.UU.) a una concentración de 1/1000.

Los cubreobjetos se montaron con Vectashield con DAPI (para teñir los núcleos) y la intensidad de la señal de fluorescencia fue puntuada en una escala de 0 a 3 por dos

investigadores independientes. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

4.3.2 ICC en neuronas humanas derivadas de neuroblastoma

Las células SH-SY5Y se colocaron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con laminina a 2,5 µg/ml. Las células se cultivaron en un medio de proliferación que contenía DMEM/F12 (1:1), suero bovino fetal (10%), L-glutamina (1%) y piruvato sódico (1%). Tras 24 horas, el medio de proliferación se sustituyó por un medio de diferenciación que contenía Neurobasal complementado con B27, Glutamax, NGF y ácido retinoico a 10 µM (Sigma). A continuación, se sustituyó el medio cada dos días hasta lograr la diferenciación completa. En los días 5 o 6 de la diferenciación, las células se fijaron durante 15 minutos con PFA al 4%; y se bloquearon con suero normal de cabra al 5% en PBS; seguido de la incubación con sueros de pacientes a 1/40 (para IgM) o a 1/100 (para IgG). Para observar la correcta diferenciación de las células también las incubamos con un anticuerpo monoclonal anti-panNeurofascina (R&Dsystems) a 1/200. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-IgG de pollo AF594 y anti-IgG o anti-IgM humana AF488 a una concentración de 1/1000.

Los cubreobjetos se montaron con Vectashield con DAPI y la intensidad de la señal de fluorescencia fue puntuada en una escala de 0 a 3 por dos investigadores independientes. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

4.3.3 ICC en células de Schwann murinas

Las células de Schwann se obtuvieron de nervios ciáticos de crías de rata de 3 días de edad y se cultivaron en medio DMEM con glucosa, suero bovino fetal (FBS) (Gibco), NGF y penicilina-estreptomicina (Lonza). Tras 24 horas, se añadió Ara-C al medio para eliminar los fibroblastos. Tres días después, se cambió el medio por un medio comercial para células de Schwann (ScienCell, CA, EE.UU.) complementado con FBS, penicilina-estreptomicina, forskolina (Sigma) y neuregulina 1-β1 (NRG1-β1) (R&D systems). Este medio se sustituyó cada dos días hasta que las células proliferaron lo suficiente. Las células se disociaron con tripsina 0,25% y se colocaron en cubreobjetos recubiertos de PDL hasta alcanzar un 70-

80% de confluencia. A continuación, las células se fijaron con PFA al 4%, se bloquearon durante 1 hora con suero de cabra al 5% y se congelaron a -80°C hasta que se realizaron los experimentos.

La ICC se realizó utilizando sueros de pacientes diluidos 1/100 (para IgG) o 1/40 (para IgM) y anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG o IgM humana (1/1000). Los cubreobjetos se montaron con Vectashield con DAPI y la intensidad de la señal de fluorescencia fue puntuada en una escala de 0 a 3 por dos investigadores independientes. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

4.3.4 IHC en nervio periférico de mono

Los portaobjetos de tejido de nervio periférico de macaco (Inova Diagnostics, Inc., San Diego, CA) se bloquearon con suero normal de cabra al 5% en PBS; se incubaron 1 hora con sueros de pacientes a 1/10 (para IgM) o 1/20 (para IgG), y posteriormente se incubaron 1 hora más con anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG o IgM humana a una concentración de 1/500. Por último, los portaobjetos se montaron con medio Fluoromount (Sigma) y fueron examinados por dos observadores independientes. Los patrones de reactividad se analizaron puntuando la intensidad de la señal de fluorescencia de cada estructura nerviosa en una escala de 0 a 3. Las estructuras nerviosas analizadas fueron: nodos o paranodos, mielina de fibras mielinizadas pequeñas, mielina de fibras mielinizadas grandes, células de Schwann de fibras no mielinizadas, axones de fibras grandes y axones de fibras pequeñas. La reactividad contra otras estructuras no nerviosas (fibroblastos, tejido conectivo, vasos) no se consideró en el análisis.

Para estudiar más a fondo los patrones de tinción, se incubaron los portaobjetos de tejido nervioso periférico con un anticuerpo monoclonal anti-CD56 (Becton Dickinson, Nueva Jersey, EE.UU.) a 1/50 para teñir las células de Schwann no mielinizantes; o con un anticuerpo anti-S100 (Abcam) a 1/50 para teñir las células de Schwann mielinizantes.

Las imágenes se adquirieron con el microscopio confocal Leica TSC SP5.

4.3.5 Inmunoprecipitación

Los sueros que mostraron una reactividad moderada o fuerte (puntuaciones 2 o 3) contra las neuronas de GRD de rata se utilizaron para los experimentos de inmunoprecipitación (IP) utilizando los mismos tipos de células como sustratos. Como método de IP se usó agarosa unida a proteína A y G (Invitrogen) para aislar IgG, o agarosa unida a anti-IgM humana (Sigma). Después de incubar el suero problema con las neuronas vivas, las partículas de agarosa se dejaron unir durante toda la noche al extracto de cultivo celular de neuronas incubadas previamente con el suero. Las proteínas precipitadas se separaron de las partículas de agarosa utilizando el tampón de muestra Laemmli (BioRad, CA, USA) con un 5% de 2-mercaptoetanol y se separaron por electroforesis.

Las bandas de proteínas que aparecieron con las IP de suero de los pacientes, pero no en los controles, se analizaron por espectrometría de masas. Las proteínas se seleccionaron como antígenos candidatos utilizando Anaxomics (Anaxomics Biotech SL, España). Antes de filtrar, el software eliminó los antígenos inespecíficos y de baja señal de los datos cargados, y sólo se analizaron las entradas que cumplían los siguientes criterios: a) puntuación de la proteína detectada >100, b) cobertura de la secuencia peptídica de la proteína >5% o c) dos o más péptidos de la misma proteína identificados con la ausencia del mismo criterio en la muestra de control. Tras este tratamiento, el software aplicó un conjunto de filtros secuenciales de inclusión, que incluían: proteínas expresadas en el nervio o el cerebro, proteínas de membrana y proteínas de superficie.

4.3.6 Validación de antígenos candidatos

Después del filtraje de proteínas, se trató de validar los antígenos candidatos en los sueros en los que se había realizado la IP. Se transfectaron plásmidos de expresión génica de ALCAM, AXL, DPYSL2, GAS6, L1CAM, NCAM1 y NrCAM humanos (Origene, Rockville, MD) en células HEK293 utilizando Lipofectamina 2000. Estas células se fijaron posteriormente con PFA al 4%, se bloquearon durante 1h con suero de cabra al 5% y se congelaron a -80°C hasta que se realizaron los experimentos de ICC. Posteriormente, los cubreobjetos se descongelaron y se incubaron con los sueros problema a 1/100 para IgG y a

1/40 para IgM. Una hora más tarde, se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG o IgM humana (Molecular probes, Oregón, EE.UU.) a una concentración de 1/1000. El éxito de la transfección y la expresión del transgén se confirmó marcando estas células con un anticuerpo comercial, y los cubreobjetos teñidos se montaron con Vectashield con DAPI. Los detalles de la ICC usada en cada validación se pueden observar en la tabla 5.

Uno de los antígenos candidatos (VINC) fue validado por ELISA, y el protocolo seguido fue el mismo que el usado para detectar los anticuerpos anti-nodo/paranodales.

Plaásmido	Proteína de interés	Células permeabilizadas	Anticuerpo primario	Dilución del anticuerpo	Anticuerpos secundarios	Dilución de los anticuerpos
pCMV6-ALCAM-Myc-DDK (RC219251, Origene)	ALCAM	No	Mouse anti-Myc (CBL430 Millipore)	1:200	GAM IgG 488, GAH IgG 594	1:1000, 1:1000
pCMV6-AXL-Myc-DDK (RC206431, Origene)	AXL	Sí	Mouse anti-Myc (CBL430 Millipore)	1:200	GAM IgG 488, GAH IgG 594	1:1000, 1:1000
pReceiverM02-DPYSL2 (EX-M0208-M02-10, Genecopoeia)	DPYSL2	Sí	Rabbit anti-DPYSL2 (ab129082 Abcam)	1:100	Ganti-Rat IgG 488, GAH IgG 594	1:1000, 1:1000
pCMV6-GAS6-Myc-DDK (RC207916, Origene)	GAS6	Sí	Mouse anti-Myc (CBL430 Millipore)	1:200	GAM IgG 488, GAH IgG 594	1:1000, 1:1000
pCMV6-L1CAM-Myc-DDK (RC211601, Origene)	L1CAM	Sí	Mouse anti-Myc (CBL430 Millipore)	1:200	GAM IgG 488, GAH IgG 594	1:1000, 1:1000
pCMV6-NCAM1-C-His (EX-X0019-M77 Genecopoeia)	NCAM1	No	Mouse anti-NCAM (347740 BD Biosciences)	1:1000	GAM IgG 488, GAH IgG 594	1:1000, 1:1000
pCMV6-NrCAM (EX-H0649-M02, Genecopoeia)	NrCAM	Sí	Rat anti-HA (supplier)	1:20000	Ganti-Rat IgG 488, GAH IgG 594	1:1000, 1:1000

Tabla 5. Lista de antígenos candidatos evaluados mediante ensayos celulares.

4.4 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software). La comparación estadística de las proporciones entre los grupos se realizó mediante un análisis de contingencia con la aplicación de la Chi-cuadrado y una prueba exacta de Fisher de dos colas, aceptando un nivel alfa $<0,05$ para la significación estadística. Para representar los resultados y realizar la agrupación jerárquica de los resultados se realizaron diagramas de mapas de calor (*heatmaps*) utilizando la herramienta web Clustvis (148).

Para investigar la asociación entre los anticuerpos anti-gangliósido y el pronóstico se realizó un análisis de regresión logística multivariable para predecir la incapacidad para caminar a los 6 meses y al año de seguimiento ($GDS \geq 3$) utilizando el software STATA.

En primer lugar, realizamos un análisis de regresión logística multivariable para predecir la capacidad de correr al año de seguimiento. En segundo lugar, realizamos un análisis de regresión lineal multivariable para investigar la asociación entre logNfL y la escala I-RODS a 1 año. En ambos análisis se realizó un modelo de regresión paso a paso y eliminación hacia atrás (*stepwise backward regression modeling*) para seleccionar las variables asociadas de forma independiente con el resultado. Los análisis estadísticos realizados y las variables introducidas en nuestros modelos multivariados fueron predefinidos en base a factores pronósticos conocidos (edad, GDS, diarrea, MRC *sum score* a 1 semana y AMAN).

En primer lugar, se realizó un modelo de regresión secuencial (*stepwise backward regression modeling*) para seleccionar las variables asociadas de forma independiente con el resultado. Las variables introducidas en nuestro modelo multivariable se seleccionaron en base a factores pronósticos conocidos: edad, GDS inicial, diarrea, AMAN, niveles séricos de NfL (analizados en un estudio previo realizado con la misma cohorte)(76), anticuerpos IgG anti-GM1 séricos y anticuerpos IgG anti-GD1a séricos (149–152). Para realizar el análisis multivariable excluimos a los pacientes con SMF, ya que éste se considera una enfermedad diferente, con una fisiopatología diferente, una presentación clínica diferente (no se presenta con debilidad) y un pronóstico diferente (se considera autolimitado y benigno), que a menudo no requiere de tratamiento. Por último, se evaluó la capacidad de la variable "presencia de anticuerpos IgG anti-GM1" para predecir la

incapacidad para correr al año de seguimiento ($GDS \geq 2$) incluyéndola en nuestro análisis de regresión logística multivariable previamente reportado(76). Se reportaron las odds-ratios (OR) del análisis de regresión logística, los intervalos de confianza del 95% y los valores de p.

5. RESULTADOS

5.1 Estudio en pacientes con SGB esporádico

5.1.1 Características basales de los pacientes

Se incluyeron 100 pacientes de 11 centros españoles que participaron en el estudio IGOS. Los pacientes con SGB tenían una media de 57,4 años y eran predominantemente hombres (57%). El 65% de los pacientes presentaban la variante sensitivo-motora, el 19% la variante motora pura, el 10% SMF, el 5% la variante sensitiva pura y 1 paciente la variante atáxica. En cuanto a los estudios de conducción nerviosa, el 59% de los pacientes fueron clasificados como AIDP, el 12% como AMAN, el 7% como AMSAN, el 8% como normal y el 14% como estudio equívoco. Las características epidemiológicas detalladas de la cohorte se describieron en un artículo anteriormente publicado (76).

5.1.2 Protocolo general

Los experimentos de cribado de autoanticuerpos incluyeron la detección de anticuerpos anti-gangliósido mediante ELISA, la detección de anticuerpos nodo/paranodales (NF155, NF140, NF186, CNTN1 y complejo CNTN1/CASPR1) mediante ELISA y ensayos basados en células, inmunocitoquímica con sueros de pacientes en neuronas motoras humanas derivadas de neuroblastomas y en neuronas de GRD murinos (IgG e IgM) y evaluación del patrón de reactividad por inmunohistoquímica en secciones de nervio ciático de mono (IgG e IgM).

5.1.3 Cribado de autoanticuerpos conocidos

Ninguno de los pacientes con SGB incluidos en el estudio reaccionó contra las proteínas paranodales y nodales analizadas (NF155, NF140, NF186, CNTN1 y CASPR1).

Sesenta y un pacientes dieron positivo para, al menos, un anticuerpo anti-gangliósido (GM1, GM2, GM3, GD1b, GD3, aGM1, GT1a, GT1b y GQ1b). De ellos, 40 tenían anticuerpos IgG, 3 tenían anticuerpos IgM y 18 tenían anticuerpos de ambos isotipos. Las reactividades detalladas se muestran en la figura 14.

Los anticuerpos anti-gangliósido más frecuentes en nuestra cohorte fueron aGM1, GM1, GD1b y GQ1b. En general, se detectaron anticuerpos IgG anti-aGM1 en el 40 % de los pacientes; se detectaron anticuerpos IgG e IgM anti-GM1 en el 27 % y el 15 % de los pacientes respectivamente, anticuerpos IgG anti-GD1b en el 30 % y anticuerpos IgG anti-GQ1b en el 21 % de los pacientes.

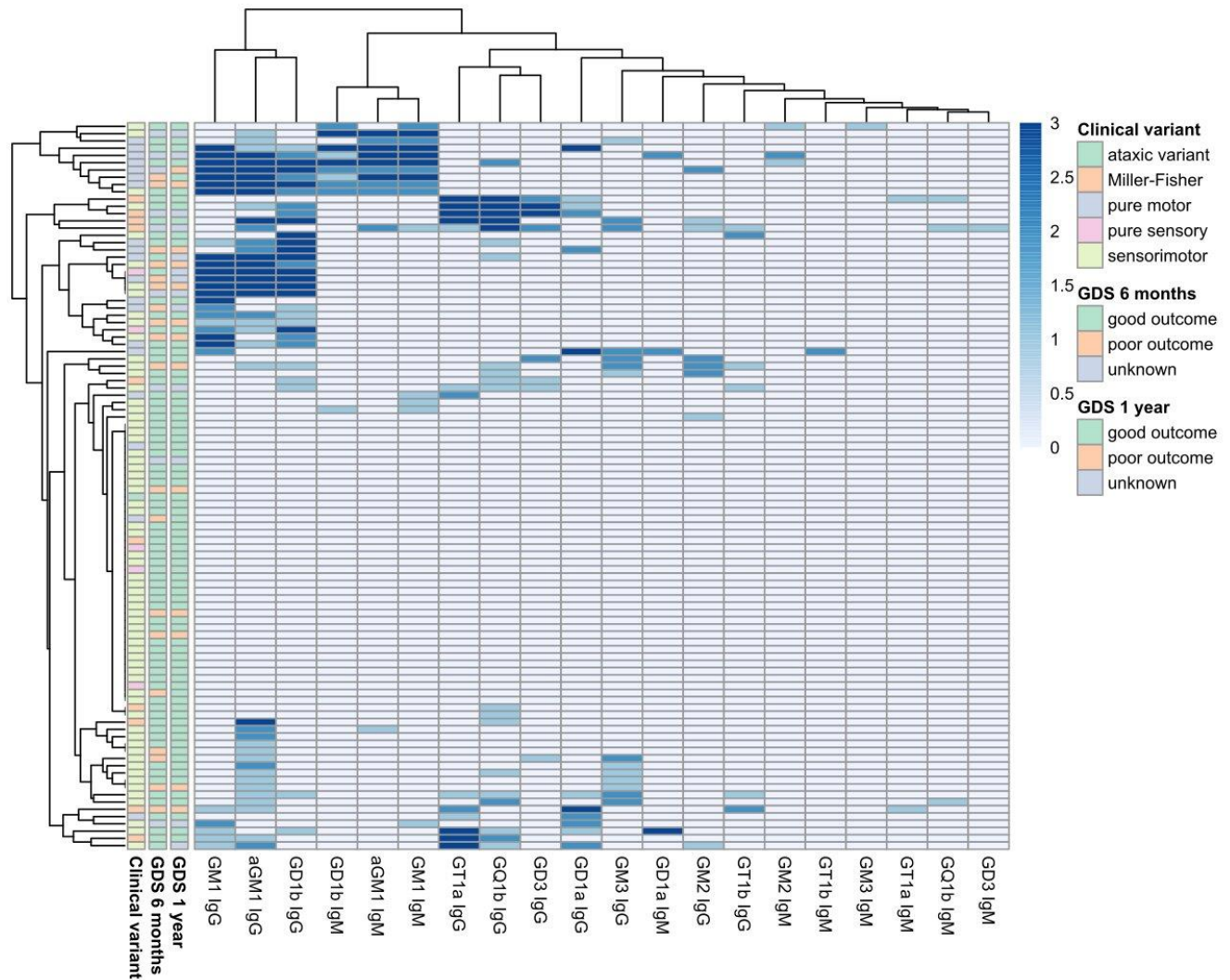


Figura 14. *Heatmap* que muestra los anticuerpos anti-gangliósido observados en la cohorte de pacientes con SGB. Cada fila representa un paciente. La puntuación de los títulos de anticuerpo se indica por el color del cuadrado (0 = <1/1000, 1 = 1/1000 a 1/2500, 2 = 1/2500 a 1/12500, 3 = >1/12500). Las columnas de la izquierda contienen información relacionada con la variante clínica y el estado de los pacientes a los 6 meses y al año de seguimiento.

5.1.4 Autoanticuerpos contra neuronas del nervio periférico

Se utilizaron experimentos de ICC con cultivos primarios de neuronas de GRD de rata y neuronas motoras humanas derivadas de una línea celular de neuroblastoma para identificar nuevas reactividades de IgG e IgM contra neuronas de los nervios periféricos. El cribado se realizó en 100 muestras de suero de pacientes con SGB y 90 muestras de suero de un grupo de control (que incluía controles sanos y pacientes con otras enfermedades neuromusculares). Los resultados se agruparon en tres categorías distintas: positivos moderados o fuertes (incluyendo las puntuaciones 2 y 3), todos los positivos (incluyendo las puntuaciones 1, 2 y 3) y los negativos (puntuación 0). Los resultados detallados se muestran en la tabla 5 y en la figura 15.

En general, 22 (22%) pacientes con SGB reaccionaron moderada o fuertemente contra las neuronas de GRD o de neuroblastoma, mientras que 4 (4,4%) controles reaccionaron sólo moderadamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0005$).

Los anticuerpos contra neuronas de GRD aparecieron con una frecuencia significativamente mayor en los pacientes con SGB que en los controles (32% vs 6,7%, $p<0,0001$) teniendo en cuenta todos los resultados positivos; lo mismo ocurrió si sólo se consideraron los positivos moderados y fuertes, tanto en los experimentos con IgG (6% vs 0%, $p=0,03$) como con IgM (11% vs 2,2%, $p=0,02$)

En los experimentos en neuronas derivadas de neuroblastoma, 28 (28%) muestras del grupo de SGB mostraron autoanticuerpos IgM; de ellas, 8 (8%) mostraron una reactividad moderada o fuerte. Estas proporciones fueron significativamente mayores que en el grupo de control (12,2% y 2,2% respectivamente; $p=0,011$). No se observaron diferencias en las proporciones de autoanticuerpos entre los pacientes con SGB y los controles en los experimentos con neuronas derivadas de neuroblastoma cuando se evaluaron los anticuerpos IgG.

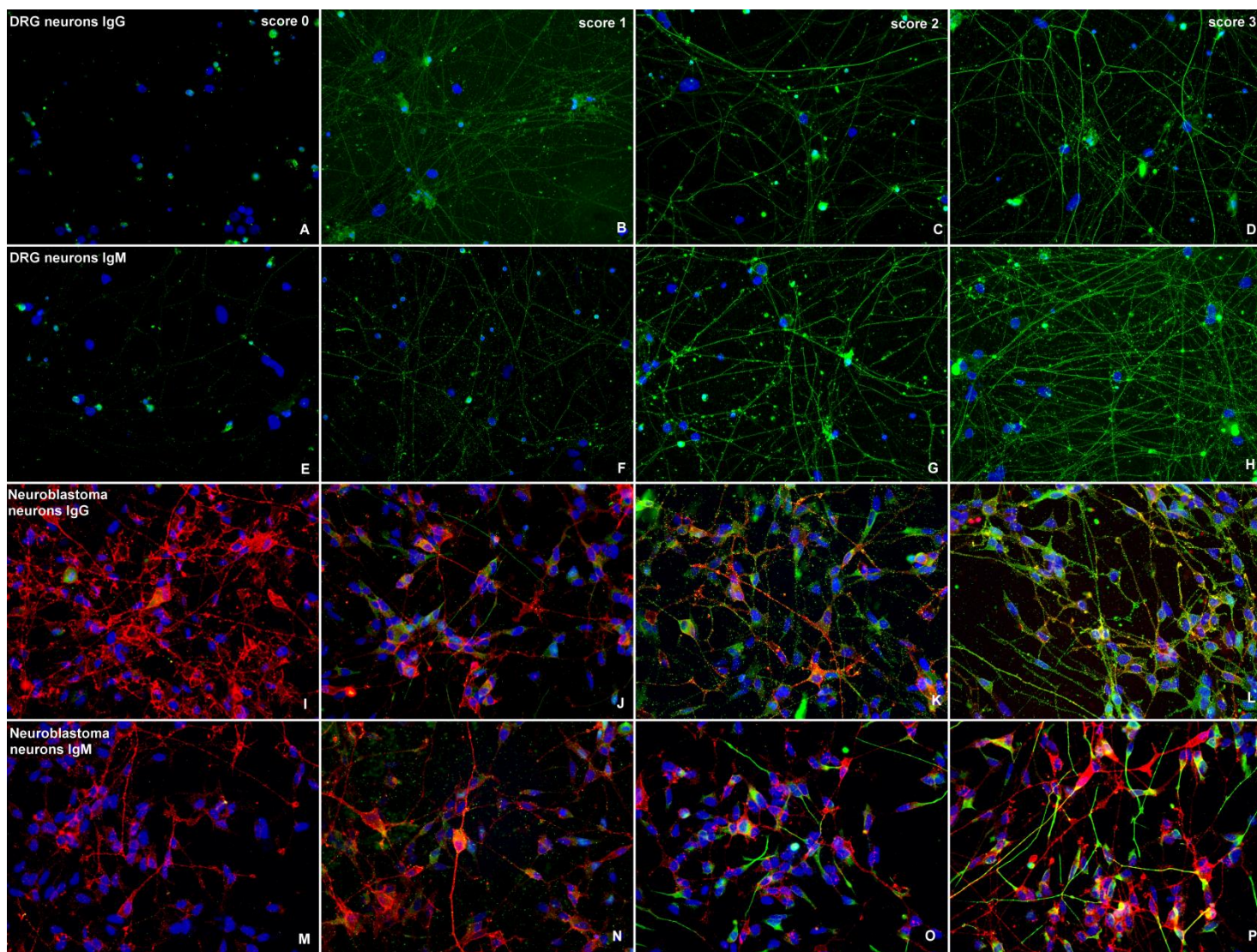


Figura 15. Patrones de tinción analizados en ICC sobre neuronas de GDR de rata y neuronas humanas derivadas de neuroblastoma. Las neuronas de GDR (A-H) o las neuronas del neuroblastoma (I-P) se tiñeron con sueros de controles o de pacientes en verde. La intensidad de la señal de la reactividad IgG (A-D, I-L) o IgM (E-H, M-P) se puntuó en una escala de 0 a 3 (0=negativo, 1=positivo leve, 2=positivo moderado, 3=positivo fuerte). Las neuronas del neuroblastoma se tiñeron de rojo con un anticuerpo comercial anti-Neurofascina.

	Pacientes SGB (n = 100)		Controles (n=90 / 56)		p	
	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte
Neuronas de neuroblastoma IgG	11 (11 %)	2 (2 %)	10/90 (11.1 %)	0/90 (0.0 %)	>0.999	0.499
Neuronas de neuroblastoma IgM	28 (28 %)	8 (8 %)	11/90 (12.2 %)	2/90 (2.2 %)	0.011 (*)	0.105
Neuronas de GRD IgG	32 (32%)	6 (6 %)	6/90 (6.7 %)	0/90 (0.0 %)	<0.0001 (***)	0.030 (*)
Neuronas de GRD IgM	34 (34 %)	11 (11 %)	22/90 (24.4 %)	2/90 (2.2 %)	0.156	0.020 (*)
Nervio periférico de mono IgG	56 (56 %)	17 (17 %)	30/56 (53.6 %)	3/56 (5.4 %)	0.8669	0.0455 (*)
Nervio periférico de mono IgM	44 (44 %)	10 (10 %)	20/56 (35.7 %)	6/56 (10.7 %)	0.3964	>0.999

Tabla 5. Análisis estadístico de la ICC en neuronas de GRD y de neuroblastoma, y de la IHC en nervio periférico de mono. Comparación entre los pacientes con SGB y los controles. La reactividad fuerte incluye las puntuaciones 2 y 3, y cualquier reactividad incluye las puntuaciones 1, 2 y 3. Las puntuaciones de intensidad de fluorescencia se analizaron mediante un análisis de contingencia con la aplicación de una prueba exacta de Fisher. La significación estadística se fijó en 0,05.

5.1.5 Autoanticuerpos contra tejido nervioso periférico

Analizamos la cohorte completa de SGB (n=100) y 56 controles. Analizamos la intensidad de tinción de 6 estructuras diferentes dentro del nervio, incluyendo los nodos o paranodos, la mielina de las fibras mielinizadas pequeñas, la mielina de las fibras mielinizadas grandes, las células de Schwann de las fibras no mielinizadas, los axones de las fibras grandes y los axones de las fibras pequeñas. Los patrones de tinción analizados se muestran en la figura 16.

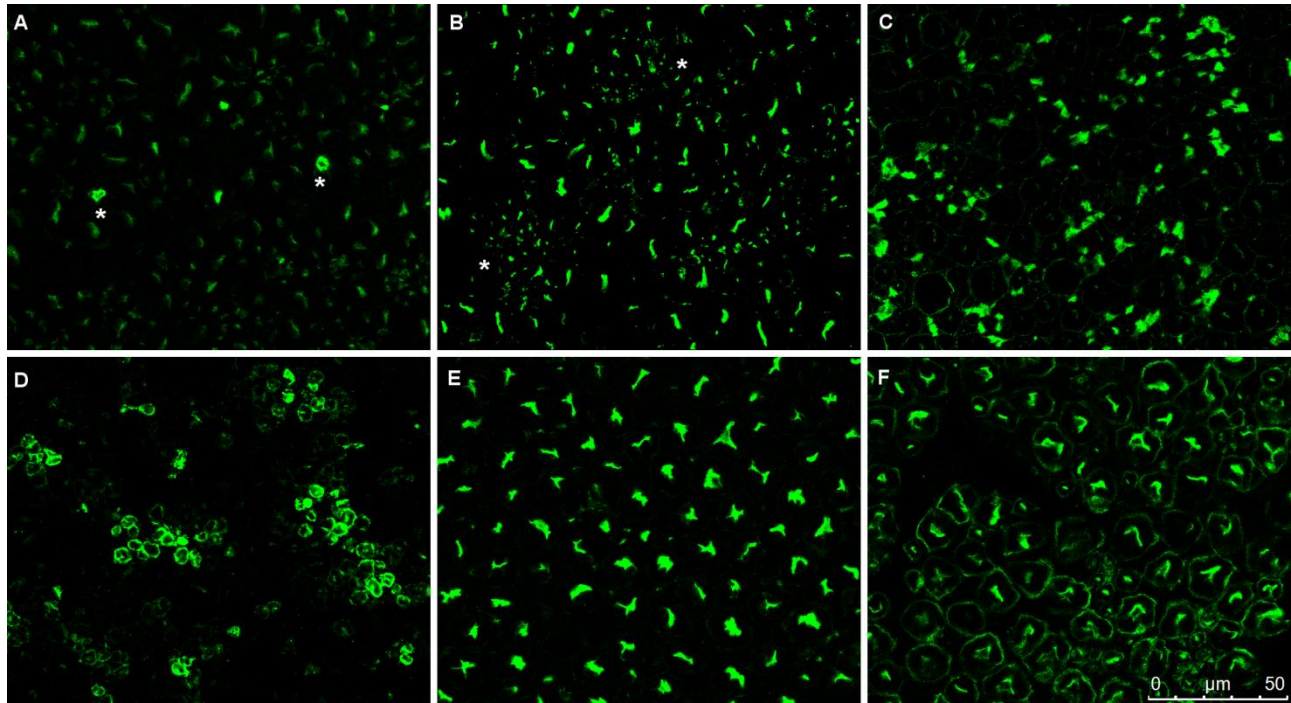


Figura 16. Patrones de tinción analizados en IHC sobre nervio periférico de mono. Secciones transversales de nervio periférico de macaco teñidas con suero de un paciente con CIDP con anticuerpos anti-CNTN1 reaccionando contra paranodos (A), o con sueros de pacientes con SGB que reaccionaron contra axones de fibras pequeñas (B), células de Schwann no mielinizadas (C), mielina de fibras pequeñas mielinizadas (D), axones de fibras grandes (E), y mielina de fibras grandes mielinizadas (F).

La reactividad de IgG e IgM contra el tejido nervioso se detectó con frecuencia en los pacientes con SGB y en los controles. En general, alrededor del 70% de los sueros de pacientes y controles de SGB se unieron a las estructuras nerviosas. Diecisiete (17%) pacientes con SGB reaccionaron moderadamente y 10 (10%) reaccionaron fuertemente contra las estructuras nerviosas analizadas. En el grupo control, las IgG e IgM reaccionaron moderadamente en 8 (14,3%) y fuertemente en 1 (1,8%) pacientes. La diferencia entre la cantidad de pacientes con SGB y los controles que reaccionaron moderada o fuertemente contra el nervio periférico de mono fue estadísticamente significativa ($p=0,0455$) sólo para los autoanticuerpos IgG (tabla 5).

Las diferencias en los patrones de reactividad de los pacientes con SGB y los controles no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las estructuras analizadas (tabla 6). No obstante, algunos patrones de reactividad específicos sólo se detectaron en los pacientes con SGB y no en los controles (figura 17). Ocho (8%) IgG de pacientes con SGB reaccionaron fuertemente contra la mielina, mientras que sólo 2 controles mostraron una reactividad débil contra esta estructura. Además, observamos que 13 (13%) pacientes con SGB tenían una fuerte reactividad IgG contra las células de Schwann (mielinizantes y no mielinizantes) mientras que sólo uno de los controles (1,8%) mostraba una fuerte reactividad contra las células de Schwann (esta diferencia es estadísticamente significativa; $p=0,0192$).

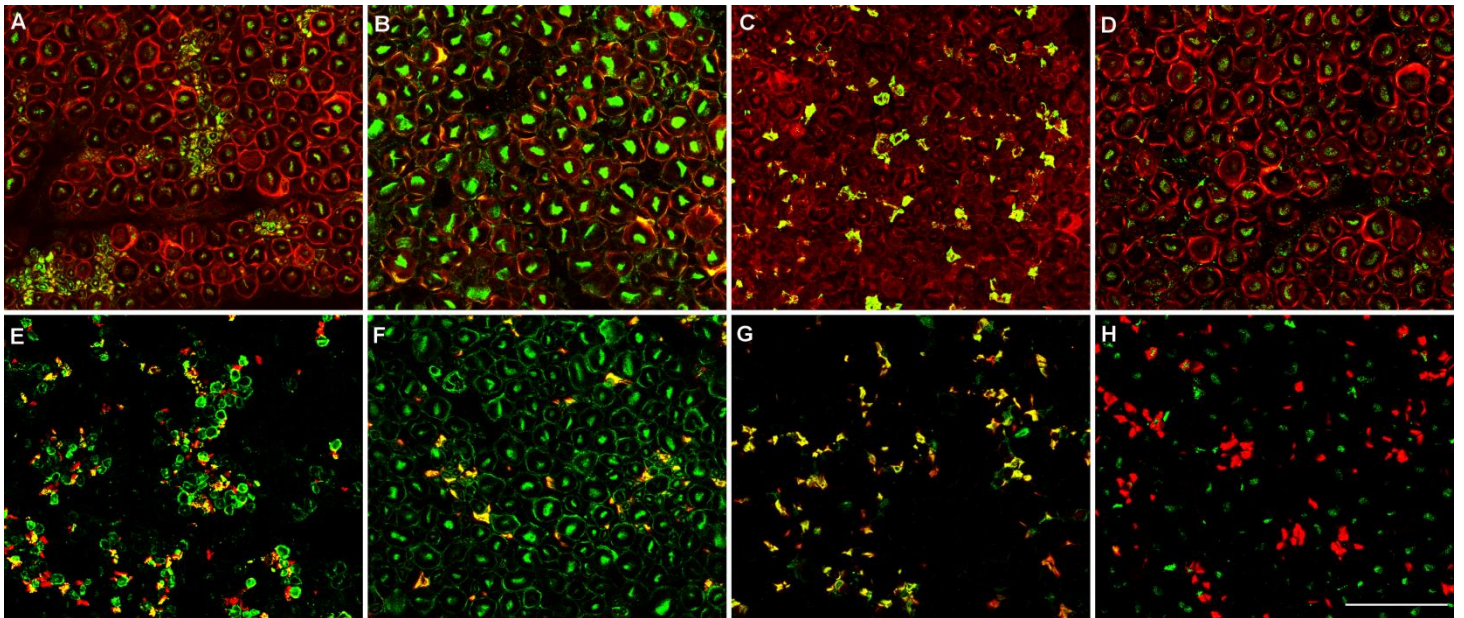


Figura 17. Reactividad contra las células de Schwann en secciones de nervio periférico. Secciones de nervio periférico de macaco teñidas en rojo con el anticuerpo monoclonal S100 (A-D) o CD56 (NCAM) (E-H), y en verde con sueros de pacientes con SGB que reaccionaron contra la mielina de fibras mielinizadas pequeñas (A,E), la mielina de fibras mielinizadas grandes (B,F) y las células de Schwann no mielinizadas (C,G). D y H son tinciones con sueros de controles negativos.

		Pacientes SGB (n = 100)		Controles (n= 56)		p	
		Cualquier reactividad	Reactividad fuerte	Cualquier reactividad	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte	Cualquier reactividad
IgG	Nodos/paranodos	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	>0.9999	>0.9999
	Mielina de fibras mielinizadas pequeñas	13 (13%)	8 (8%)	2 (3.6%)	0 (0%)	0.0866	0.0512
	Mielina de fibras mielinizadas grandes	11 (11%)	7 (7%)	4 (7.1%)	0 (0%)	0.5751	0.0501
	Células de Schwann de fibras no mielinizadas	15 (15%)	6 (6%)	3 (5.4%)	1 (1.8%)	0.1147	0.4228
	Axones de fibras grandes	49 (49%)	4 (4%)	20 (35.7%)	2 (3.6%)	0.1313	>0.9999
	Axones de fibras pequeñas	26 (26%)	1 (1%)	21 (37.5%)	0 (0%)	0.1484	>0.9999
	Cualquier reactividad contra células de Schwann	18 (18%)	13 (13%)	7 (12.5%)	1 (1.8%)	0.4959	0.0192(*)
IgM	Nodos/paranodos	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	>0.9999	>0.9999
	Mielina de fibras mielinizadas pequeñas	10 (10%)	4 (4%)	3 (5.4%)	2 (3.6%)	0.3802	>0.9999
	Mielina de fibras mielinizadas grandes	9 (9%)	2 (2%)	4 (7.1%)	2 (3.6%)	0.7716	0.6185
	Células de Schwann de fibras no mielinizadas	7 (7%)	4 (4%)	3 (5.4%)	1 (1.8%)	>0.9999	>0.9999
	Axones de fibras grandes	36 (36%)	6 (6%)	17 (30.4%)	3 (5.4%)	0.5973	>0.9999
	Axones de fibras pequeñas	11 (11%)	2 (2%)	12 (21.4%)	3 (5.4%)	0.0997	0.3507
	Cualquier reactividad contra células de Schwann	13 (13%)	7 (7%)	6 (10.7%)	3 (5.4%)	0.8012	>0.9999

Tabla 6. Análisis estadístico de las estructuras nerviosas observadas en la IHC en nervio periférico de mono. Comparación entre los pacientes con SGB y los controles. La reactividad fuerte incluye las puntuaciones 2 y 3, y cualquier reactividad incluye las puntuaciones 1, 2 y 3. Las puntuaciones de intensidad de fluorescencia se analizaron mediante un análisis de contingencia con la aplicación de una prueba exacta de Fisher, aceptando un nivel de <0,05 para determinar la significación.

5.1.6 Análisis combinado de la detección de autoanticuerpos

También analizamos si los pacientes con SGB con o sin anticuerpos anti-gangliósido diferían en los patrones de reactividad en el cribado de autoanticuerpos. No se encontraron diferencias entre ambos grupos (tabla 7), lo que sugiere que la heterogeneidad del repertorio de autoanticuerpos aparece incluso cuando se encuentra un antígeno específico.

Utilizamos un gráfico de mapa de calor para representar todos los resultados del cribado de autoanticuerpos realizado en nuestra cohorte de SGB (figura 18). Este gráfico proporciona una representación visual de la heterogeneidad del repertorio de autoanticuerpos en los sueros de SGB.

	Pacientes SGB con anticuerpos anti-gangliósido (n = 61)		Pacientes SGB sin anticuerpos anti-gangliósido (n = 39)		p	
	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte	Cualquier reactividad	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte	Cualquier reactividad
Neuronas de neuroblastoma IgG	6 (9.8%)	2 (3.3%)	5 (12.8%)	0 (0%)	0.747	0.519
Neuronas de neuroblastoma IgM	13 (21.3%)	3 (4.9%)	15 (38.5%)	5 (12.8%)	0.072	0.256
Neuronas de GRD IgG	22 (36.1%)	5 (8.2%)	9 (23.1%)	1 (2.6%)	0.191	0.400
Neuronas de GRD IgM	24 (39.3%)	8 (13.1%)	10 (25.6%)	3 (7.7%)	0.196	0.521
Nervio periférico de mono IgG	37 (60.7%)	10 (16.4%)	19 (48.7%)	7 (17.9%)	0.303	>0.999
Nervio periférico de mono IgM	22 (36.1%)	6 (9.8%)	22 (56.4%)	6 (15.4%)	0.063	0.530

Tabla 7. Comparación estadística entre pacientes con y sin anticuerpos anti-gangliósido. La reactividad fuerte incluye las puntuaciones 2 y 3, y cualquier reactividad incluye las puntuaciones 1, 2 y 3. Las puntuaciones de intensidad de fluorescencia se analizaron mediante un análisis de contingencia con la aplicación de una prueba exacta de Fisher, aceptando un nivel de <0,05 para determinar la significación.

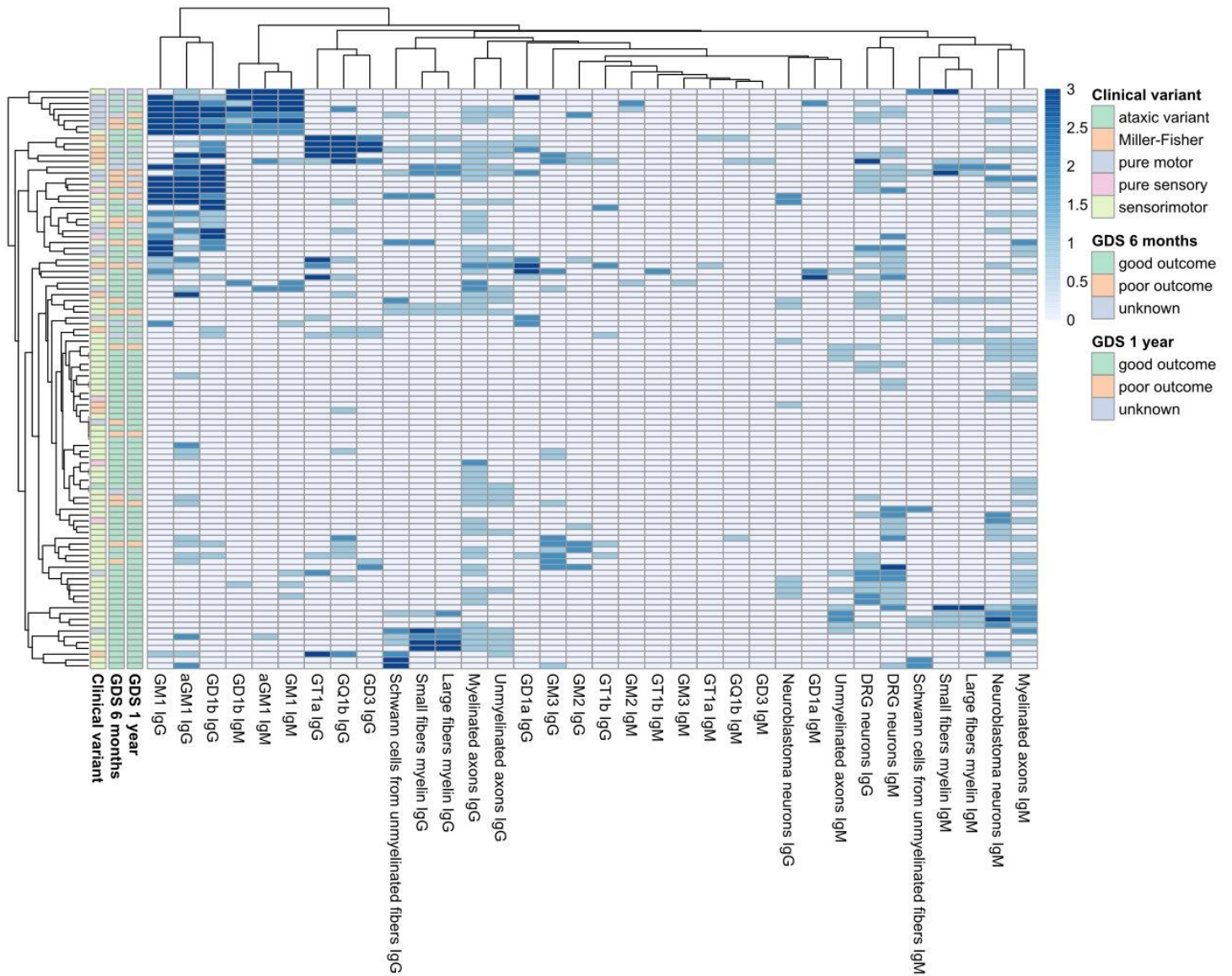


Figura 18. Heatmap que muestra todo el cribado realizado en pacientes con SGB. Cada fila representa un paciente con SGB. La puntuación del título de anti-gangliósido se indica mediante el color del cuadrado (0=<1/1000, 1=1/1000 a 1/2500, 2=1/2500 a 1/12500, 3=>1/12500). La puntuación de la intensidad de tinción en las demás estructuras se indica con el color del cuadrado (0=negativo, 1=positivo leve, 2=positivo moderado, 3=positivo fuerte). Las columnas de la izquierda contienen información relacionada con la variante clínica y el estado de los pacientes a los 6 meses y al año de seguimiento.

5.1.7 Correlaciones clínico-inmunológicas

Entre los pacientes con síndrome de Miller Fisher, 8/10 (80%) tenían anticuerpos IgG anti-GQ1b, mientras que en el resto de pacientes con SGB sólo el 14,4% (13/90) tenían estos anticuerpos, normalmente en combinación con otras reactividades. Los anticuerpos IgG anti-GM1 se detectaron con mayor frecuencia en los pacientes con la variante motora pura que en los que presentaban otras variantes clínicas (13/19 (68,4%) frente a 14/81 (17,3%)); y en los pacientes clasificados electrofisiológicamente como AMAN que en el resto de pacientes con SGB (83,3% frente a 19,3%). Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,0001$, figura 19).

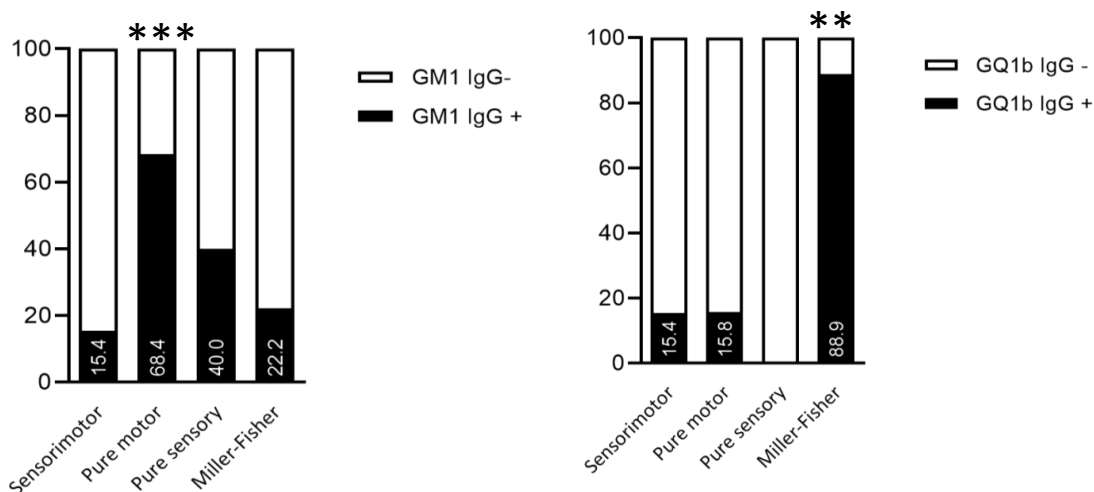


Figura 18. Representación gráfica de los porcentajes de pacientes con anticuerpos anti-GM1 y anti-GQ1b en cada variante clínica del SGB.

Cuando analizamos las características clínicas generales del subgrupo de pacientes con fuerte reactividad IgG contra las células de Schwann ($n=13$), no observamos ningún patrón específico que pudiera distinguirlos del resto de la cohorte. Diez (76,9%) de estos pacientes presentaban la variante clínica sensitivo-motora, mientras que en la cohorte general el 65% presentaba esta variante; y las proporciones de las diferentes variantes electrofisiológicas eran similares a las encontradas en la cohorte general (53,8% de los pacientes con reactividad contra células de Schwann frente al 59% de la cohorte general presentaban la variante AIDP). En cuanto al pronóstico, el porcentaje de pacientes con un buen estado ($GDS < 3$) a los 6 meses y al año es similar en los 2 grupos (alrededor del 75%).

En el subgrupo de pacientes con reactividad IgG o IgM contra neuronas de GRD (n=14), no encontramos diferencias clínicas con toda la cohorte de SGB. Brevemente, el 71,4% de los pacientes que tiñeron fuertemente las neuronas fueron clasificados como AIDP, y el 64,3% presentaron la variante clínica sensitivo-motora.

No detectamos ninguna diferencia en los patrones o frecuencias de reactividad de las células nerviosas periféricas y de los tejidos entre las muestras recogidas antes de iniciar el tratamiento (62%) y las recogidas después del mismo (38%). Tampoco observamos ninguna correlación de ninguno de los patrones de reactividad con otras características clínicas como el dolor, la ataxia o la presencia de una infección previa.

5.1.8 Valor pronóstico de los anticuerpos antigangliósidos

En primer lugar, realizamos un análisis univariante para seleccionar las variables que se asociaban con el pronóstico. Los pacientes con anticuerpos IgG anti-GM1 en suero presentaron peor pronóstico que los pacientes sin los anticuerpos a los 6 meses (38,1% frente a 16,1% (p=0,04)), y al año (35,3% frente a 9,7% (p=0,014)). Los anticuerpos IgG anti-GD1a no se asociaron con el pronóstico (tabla 2). Para el análisis multivariante incluimos los anticuerpos anti-GM1 IgG, los niveles séricos de NfL, la diarrea, la edad y el GDS inicial.

Observamos que tener anticuerpos anti-GM1 IgG al inicio de la enfermedad se asociaba de forma independiente con la incapacidad para caminar al año de seguimiento, tras un modelo de regresión paso a paso (OR=6,98; IC 95%=1,6-30,36; p=0,01). Sin embargo, la presencia de anticuerpos IgG anti-GM1 no se asoció de forma independiente a tener un mal pronóstico a los 6 meses (tabla 8).

Para analizar si los títulos anti-GM1 se asociaban con la puntuación de discapacidad del SGB, realizamos una regresión lineal. No observamos una correlación positiva entre los títulos de anticuerpos y la discapacidad a los 6 meses y al año.

Por último, cuando incluimos la presencia de anticuerpos anti-GM1 en nuestro modelo pronóstico previamente reportado (76), observamos que tener anticuerpos IgG anti-GM1 al inicio de la enfermedad se asociaba con la incapacidad para correr al año, pero esta

asociación no era independiente de los otros factores pronósticos conocidos; y los sNFL, la edad y AMAN permanecían en el modelo como factores independientes asociados con la discapacidad residual al año.

Análisis univariante			
Inhabilidad para andar independientemente a los 6 meses			
Variable	OR	95% IC	p
GM1 IgG	3.2	1.05-9.71	0.04
GD1a IgG	0.48	0.05-4.24	0.515
logNFL	3.22	1.46-7.14	0.004
AMAN	2.97	0.73-12.07	0.127
Diarrea	3.64	1.21-10.91	0.021
Edad	1.05	1.01-1.10	0.005
GDS inicial	3.15	1.38-7.18	0.006

Análisis multivariante			
Inhabilidad para andar independientemente a los 6 meses			
Variable	OR	95% IC	p
logNFL	3.13	1.27-7.67	0.012
Edad	1.05	1.01-1.10	0.013

Análisis univariante			
Inhabilidad para andar independientemente al año			
Variable	OR	95% IC	p
GM1 IgG	5.09	1.38-18.73	0.014
GD1a IgG	0.92	0.10-8.44	0.944
logNFL	3.11	1.27-7.55	0.012
AMAN	1.475	0.27-7.97	0.652
Diarrea	2.7	0.74-9.82	0.131
Edad	1.06	1.01-1.11	0.014
GDS inicial	2.79	1.12-6.93	0.027

Análisis multivariante			
Inhabilidad para andar independientemente al año			
Variable	OR	95% IC	p
GM1 IgG	6.98	1.60-30.36	0.01
Edad	1.07	1.01-1.12	0.01

Análisis univariante			
Inhabilidad para correr independientemente al año			
Variable	OR	95% IC	p
GM1 IgG	4.16	1.39-12.49	0.011
GD1a IgG	0.72	0.13-3.99	0.710
logNFL	4.37	1.95-9.78	<0.0001
AMAN	6.53	1.57-27.17	0.01
Diarrea	2.33	0.83-6.57	0.109
Edad	1.04	1.01-1.07	0.023
GDS inicial	1.81	1.08-3.04	0.025

Análisis multivariante			
Inhabilidad para correr independientemente al año			
Variable	OR	95% IC	p
Edad	1.04	1.01-1.08	0.022
AMAN	6.19	1.01-38.02	0.049
logNFL	3.17	1.34-7.50	0.009

Tabla 8. Asociación entre los anticuerpos anti-GM1 y anti-GD1a basales y el pronóstico. logNFL= cadena ligera de neurofilamentos transformada logarítmicamente.

5.2 Estudio en pacientes con ZIKV-SGB

5.2.1 Características basales de los pacientes

Se obtuvieron muestras de suero de un total de 129 sujetos colombianos: 31 pacientes con SGB e infección confirmada por ZIKV (ZIKV-SGB), 12 con infección por el ZIKV y otras enfermedades neurológicas inflamatorias (ZIKV-OEN, incluyendo mieloradiculopatía (n=1), encefalitis (n=3), parálisis facial periférica (n=3) o mielitis transversa (n=5)), y 77 pacientes con antecedente de infección por virus Zika sin ninguna complicación neurológica asociada (ZIKV-CON). Como controles (CON), se usaron 9 controles sanos reclutados localmente en Cúcuta y otras 38 muestras de suero de sujetos españoles (incluidos 28 controles sanos y 10 pacientes con trastornos neuromusculares no inmunes). Las características generales de los pacientes se pueden observar en la tabla 9.

Grupo	Número de muestras	Edad media; rango	% Mujeres	Días entre el inicio de los síntomas del ZIKV y la extracción de la muestra. media; rango	Días entre el inicio del SGB y la extracción de la muestra. media; rango
ZIKV-SGB	31	41; 10-69	48.4%	162; 65-579	168; 66-534
• AIDP	16	41; 10-69	56.3%	108; 67-164	122; 74-260
• AMAN	7	42; 27-62	57.1%	141; 98-271	157; 98-300
• AMSAN	3	40; 35-47	33.3%	108; 65-145	113; 66-152
• Unclassified	5	40; 34-47	20%	397; 99-579	365; 104-534
Controles	136	40; 4-88	62.5%		N/A
• ZIKV-OEN	12	27; 4-41	58.3%	139; 82-211	
• ZIKV-CON	77	39; 2-83	66.2%	160; 49-615	
• CON	47	45; 4-88	57.4%	N/A	

Tabla 9. Características generales de los pacientes y controles usados en el estudio de autoanticuerpos en el SGB post-infección por virus Zika.

Los pacientes con ZIKV-SGB tenían una media de 41 años y el 48.4% eran mujeres. En cuanto a los estudios de conducción nerviosa, el 51.6% de los pacientes fueron clasificados como AIDP, el 22.6% como AMAN, el 9.7% como AMSAN, y el 16.1% no se pudieron clasificar.

5.2.2 Protocolo general

El cribado de autoanticuerpos incluyó la detección de anticuerpos conocidos (realizados en un laboratorio de Oxford): detección de anticuerpos anti-gangliósido mediante glicoarray y detección de anticuerpos anti-nodo/paranodales mediante ICC; y la detección de nuevos autoanticuerpos mediante ICC en células de Schwann y neuronas de GRD murinas (IgG e IgM). Posteriormente se realizaron experimentos de inmunoprecipitación para tratar de encontrar nuevos antígenos diana.

5.2.3 Cribado de autoanticuerpos conocidos

Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio reaccionó contra las proteínas paranodales y nodales analizadas (NF155, NF140, NF186, CNTN1 y CASPR1).

Los sueros de todos los pacientes y los controles se analizaron frente a un panel de 136 glicolípidos. En general, el panel reveló sólo intensidades de unión débiles, y ninguna de las reactividades encontradas se asoció estadísticamente con el SGB post-ZIKV.

Se observaron dos muestras de ZIKV-SGB con anticuerpos IgG contra varios gangliósidos en niveles elevados, tal y como se ve típicamente en el SGB: una muestra presentaba IgG anti-disialosil (GQ1b, GT1a y GD3) normalmente asociada con el subtipo SMF; y otra presentaba IgG anti-GM1, típicamente presente en el subtipo clínico AMAN.

5.2.4 Autoanticuerpos contra neuronas del nervio periférico

La reactividad IgG e IgM de los sueros frente a antígenos del nervio periférico se examinó mediante ICC en cultivos primarios de neuronas de GRD y células de Schwann de rata. Los resultados se muestran en la figura 19 y la tabla 10.

Los resultados se agruparon según tres categorías distintas: positivos moderados o fuertes (incluidas las puntuaciones 2 y 3), todos los positivos (incluidas las puntuaciones 1, 2 y 3) y negativos (puntuación 0). Se observó una reactividad IgG moderada o fuerte frente a neuronas en el 16,1% (5/31) de los pacientes con ZIKV-SGB, en el 16,7% (2/12) de los pacientes con ZIKV-OEN, en el 3,9% (3/77) de los sujetos ZIKV-CON y en el 7% (3/27) de los sujetos CON, pero las diferencias entre los 4 grupos no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,119$). Por otra parte, se observaron autoanticuerpos IgM fuertemente reactivos frente neuronas en un número proporcionalmente mayor de sueros de pacientes con ZIKV-SGB (32,3%, 10/31), en comparación con ZIKV-OEN (16,7%, 2/12), ZIKV-CON (3,9%, 3/77) y CON (0%, 0/43) ($p < 0,0001$).

En el cribado en células de Schwann, se observó una mayor proporción de reactividad moderada o fuerte en el grupo ZIKV-SGB (IgG: 6,5%, 2/31; IgM: 19,4%, 6/31) en comparación con otros pacientes y controles sin complicaciones (IgG: $p = 0,0348$, IgM: $p = 0,0121$).

En general, hubo una mayor probabilidad de observar cualquier inmunorreactividad (ya sea IgG o IgM) en el suero de los pacientes ZIKV-SGB o ZIKV-OEN en comparación con el grupo ZIKV-CON: el 38,7% (12/31) de los pacientes con ZIKV-SGB y el 33,3% (4/12) de los pacientes con ZIKV-OEN reaccionaron moderada o fuertemente contra las neuronas o las células de Schwann, mientras que sólo el 10,4% (8/77) de los sujetos ZIKV-CON y el 7% (3/43) de los controles sin ZIKV reaccionaron moderadamente. Estas diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas ($p = 0,0008$).

Además, observamos que la unión de IgG e IgM a las neuronas de GRD o a las células de Schwann era significativamente más común en los sueros ZIKV-SGB que en el resto de sueros ZIKV agrupados ($p = 0,0042$); mientras que no había diferencias significativas en las proporciones de sueros ZIKV y sueros no-ZIKV ($p > 0,05$).

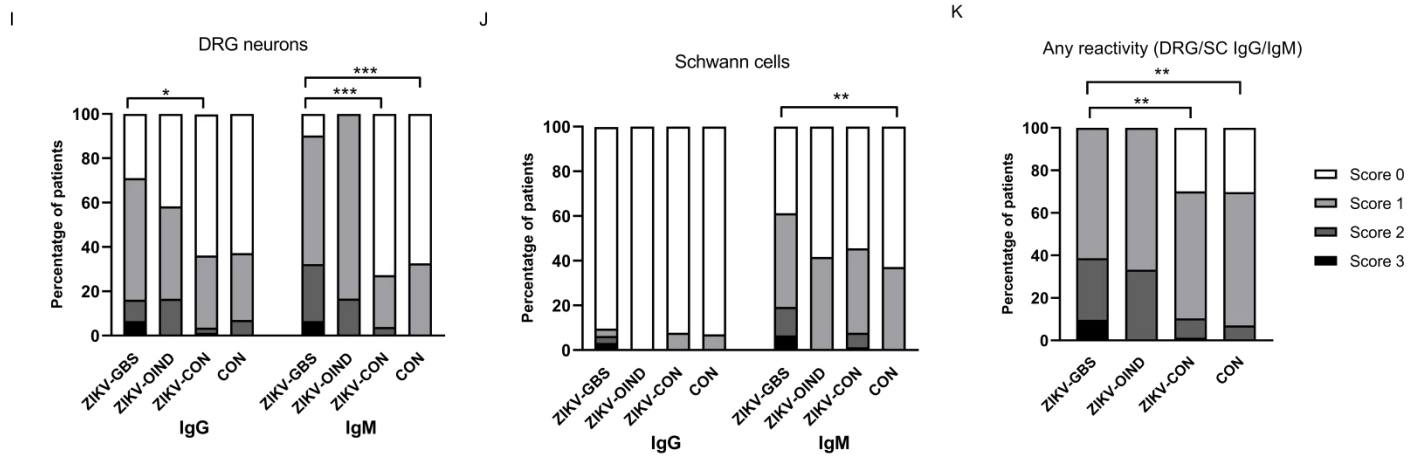
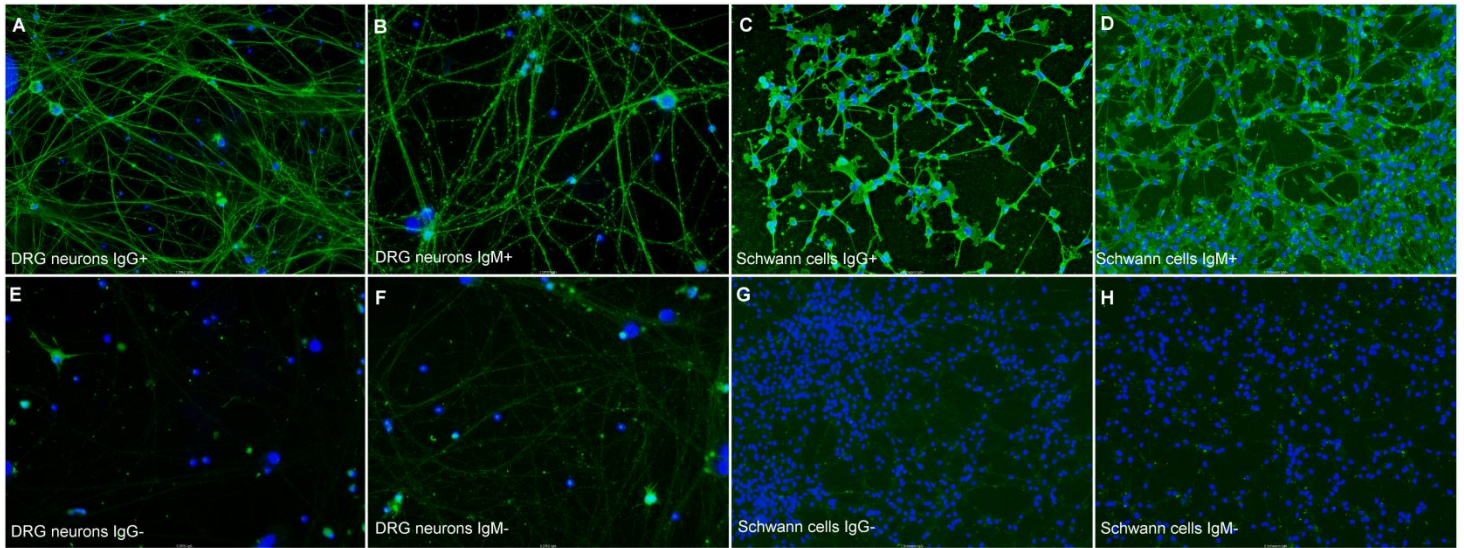


Figura 19. Reactividad de los anticuerpos IgG e IgM del suero contra neuronas de GRD y células de Schwann de rata. Las neuronas de GDR (A, B, E, F) o las células de Schwann (C, D, G, H) se tiñeron con sueros de controles (E-H) o de pacientes (A-D) en verde. La intensidad de la señal de la reactividad IgG (A, E, C, G) o IgM (B, F, D, H) se puntuó en una escala de 0 a 3 (0=negativo, 1=positivo leve, 2=positivo moderado, 3=positivo fuerte). El porcentaje de anticuerpos IgG e IgM de diferentes intensidades de los diferentes grupos de pacientes se muestran en I, J y K. Los valores p de < 0,05, < 0,01 o < 0,001 se muestran como *, ** y *** respectivamente.

		ZIKV - SGB (n = 31)		ZIKV-OEN (n = 12)		ZIKV-CON (n = 77)		CON (n = 43)		p	
		Cualquier react.	React. fuerte	Cualquier react.	React. fuerte	Cualquier react.	React. fuerte	Cualquier react.	React. fuerte	Cualquier react.	React. fuerte
Neuronas GRD	IgG	22 (71%)	5 (16.1%)	7 (58.3%)	2 (16.7%)	28 (36.4%)	3 (3.9%)	16 (37.2%)	3 (7%)	0.0054 (**)	0.1193
Neuronas GRD	IgM	28 (90.3%)	10 (32.3%)	12 (100%)	2 (16.7%)	21 (27.3%)	3 (3.9%)	14 (32.6%)	0	<0.0001 (***)	<0.0001 (***)
Células de Schwann	IgG	3 (9.7%)	2 (6.5%)	0	0	6 (7.8%)	0	3 (7%)	0	0.7464	0.0348 (*)
Células de Schwann	IgM	19 (61.3%)	6 (19.4%)	5 (41.7%)	0	35 (45.5%)	6 (7.8%)	16 (37.2%)	0	0.2256	0.0121 (*)
Cualquier reactividad (GDR o CS)	IgG/ IgM	31 (100%)	12 (38.7%)	12 (100%)	4 (33.3%)	54 (70.1%)	8 (10.4%)	30 (69.8%)	3 (7%)	0.0009 (***)	0.0004 (***)

Tabla 10. Análisis estadístico de la inmunorreactividad del suero en neuronas de GRD y en células de Schwann. La reactividad fuerte incluye las puntuaciones 2 y 3, y cualquier reactividad incluye las puntuaciones 1, 2 y 3. Las puntuaciones de intensidad de fluorescencia se analizaron mediante un análisis de contingencia con la aplicación de una prueba Chi cuadrado, aceptando un nivel de <0,05 para determinar la significación.

5.2.5 Análisis y validación de antígenos candidatos

Los sueros de dos de los pacientes con ZIKV-SGB (pacientes A y B) que mostraron una reactividad moderada o fuerte contra las neuronas de GRD, y uno de un control sano se inmunoprecipitaron. Los anticuerpos IgG del paciente A y del paciente B, o los anticuerpos IgM paciente B unidos a antígenos de las neuronas fueron aislados por IP y procesados para su análisis mediante espectrometría de masas. Se identificaron seis potenciales antígenos (ALCAM, DPYSL2, NCAM1, CNTN1, L1CAM, VINC), que estaban enriquecidos en los sueros problema en comparación con los sueros control y que tenían funciones específicas en el sistema nervioso (tabla 11).

Los antígenos candidatos identificados fueron evaluados por ELISA o por ICC en células transfectadas. Ni los anticuerpos IgG o IgM del suero del paciente A ni los del paciente B reaccionaron contra ninguno de los antígenos candidatos.

Además, analizamos la reactividad IgG e IgM de todos los sueros contra las proteínas GAS6 y AXL, que se han descrito como los receptores de entrada del ZIKV a las células neuronales humanas; así como contra la NrCAM, que comparte 6 secuencias peptídicas con la poliproteína del ZIKV. Sin embargo, ninguno de estos sueros reaccionó contra estos tres antígenos candidatos ni contra el complejo AXL-GAS6.

Antígeno diana	Función	IP de la cual se ha extraído
Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	Molécula de adhesión celular que se encuentra en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y que se ha demostrado previamente que está implicada en la trans migración de leucocitos a través del endotelio. Tiene una función importante en el mantenimiento de la integridad de la BHE. (153)	Paciente A IgG Paciente B IgM
Tyrosine-protein kinase receptor UFO (AXL)	Receptor de superficie celular por el que el ZIKV entra en las células progenitoras neurales humanas (hNPC), lo que conduce a una estimulación de las vías de señalización mediadas por AXL y a la supresión de la respuesta inmunitaria innata. Esto conduce a la infección viral en las neuronas y sus células asociadas. (154) (155)	Ninguna
Contactin-1 (CNTN1)	Proteína implicada en la formación de uniones paranodales axo-gliales en los nervios periféricos mielinizados y en la señalización entre los axones y las células gliales mielinizantes a través de su asociación con CASPR1. (156)	Paciente B IgM
Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2)	Interviene en el desarrollo y la polaridad de las neuronas, así como en el crecimiento de los axones, el colapso del cono de crecimiento neuronal y la migración celular. (157)	Paciente B IgG y IgM
Growth arrest-specific protein 6 (GAS6)	Ligando de AXL. La entrada del ZIKV mediada por AXL requiere que el ligando Gas6 sirva de puente para unir las partículas del ZIKV a las células gliales. (155)	Ninguna
Neural cell adhesion molecule L1 (L1CAM)	Molécula de adhesión celular neural expresada en la superficie axonal. En el SNP, se ha demostrado que la L1CAM está implicada en el proceso de mielinización, ya que los anticuerpos contra esta proteína inhiben la mielinización de las células de Schwann de las neuronas de GRD. (158)	Paciente A IgG Paciente B IgM
Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1)	Molécula de adhesión celular que interviene en la adhesión neurona-neurona, la fasciculación de las neuritas y su crecimiento. Recientemente se ha demostrado que actúa como receptor del ZIKV.	Paciente B IgM
Neuronal cell adhesion molecule (NrCAM)	Molécula de adhesión celular neuronal que desempeña un papel en la formación y el mantenimiento de los nodos de Ranvier en los axones mielinizados. Esta proteína comparte 6 péptidos con la poliproteína del ZIKV. (134)	Ninguna
Vinculin (VINC)	Proteína de unión de filamentos de actina que participa en la adhesión célula-matriz y en la adhesión célula-célula (159). Se ha descrito como antígeno diana en los sueros de 2 pacientes con CIDP. (160)	Paciente A IgG, Paciente B IgG

Tabla 11. Lista de antígenos candidatos en el ZIKV-SGB y sus funciones.

5.2.6 Análisis combinado de la reactividad en pacientes con SGB esporádico y pacientes con ZIKV-SGB

Cuando comparamos los resultados obtenidos en el cribado de nuevos autoanticuerpos en las dos cohortes de SGB estudiadas (SGB esporádico y ZIKV-SGB), observamos que la reactividad frente a neuronas de GRD está incrementada en los pacientes con SGB post-infección por ZIKV; especialmente la reactividad de los anticuerpos IgM (tabla 12).

	SGB esporádico (n = 100)		ZIKV-SGB (n = 31)		p	
	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte	Cualquier reactividad	Reactividad fuerte
Neuronas de GRD IgG	32 (32%)	6 (6 %)	22 (71 %)	5 (16,1%)	0.0003 (***)	0.1309
Neuronas de GRD IgM	34 (34 %)	11 (11 %)	28 (90,3%)	10 (32,3%)	<0.0001 (***)	0.01 (*)

Tabla 12. Comparación estadística entre la reactividad contra neuronas de GRD observada en pacientes SGB sin antecedente infeccioso común y pacientes ZIKV-SGB.

6. DISCUSIÓN

Nuestro trabajo describe un cribado exhaustivo de autoanticuerpos que pone de manifiesto la heterogeneidad del repertorio de autoanticuerpos en pacientes que cumplen los criterios diagnósticos de SGB.

Nuestro estudio en la cohorte española de pacientes con SGB muestra que éstos tienen un repertorio heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos a células y estructuras nerviosas. A excepción de los pacientes con anticuerpos anti-gangliósido y un subgrupo menor de pacientes con anticuerpos dirigidos a las células de Schwann y a la vaina de mielina, este repertorio varía en frecuencia e intensidad de tinción, pero no es cualitativamente diferente de los controles. Los anticuerpos dirigidos a células nerviosas periféricas son significativamente más frecuentes en los pacientes que en los controles, pero no se observan diferencias claras cuando los anticuerpos se analizan mediante IHC en nervio de mono. Teniendo en cuenta que estas preparaciones de nervio probablemente presentan antígenos proteicos en una conformación filogenéticamente más cercana a la de los nervios humanos, esto puede implicar que los autoanticuerpos dirigidos a las estructuras nerviosas están presentes en el repertorio humano normal a títulos más bajos, que surgen como un epifenómeno natural de un daño mediado por células T y no son patógenos, o que quedan por descubrir otros autoanticuerpos, dirigidos a diferentes tipos de moléculas (como lípidos o glúcidos), para los que nuestras técnicas no están optimizadas.

Estudios previos en otras neuropatías inflamatorias mostraron que la frecuencia de reactividad contra neuronas de GRD en pacientes con CIDP no difería de los controles sanos (146), contrastando con nuestros resultados (mostrados en la tabla 10). El SGB y la CIDP son enfermedades similares tanto clínica como electrofisiológicamente, por lo que esta diferencia apoya la idea de que en el SGB surge una respuesta heterogénea de autoanticuerpos contra múltiples antígenos nerviosos, mientras que esto no ocurre en las neuropatías inflamatorias desmielinizantes crónicas en las que surge una respuesta de autoanticuerpos específica, impulsada por antígenos, como apoya el reciente descubrimiento de los anticuerpos nodo-paranodales (14). Las diferencias en la gravedad de estas dos enfermedades también pueden explicar esta observación.

Observamos que el 13% de los pacientes con SGB esporádico mostraron una fuerte reactividad de IgG contra las células de Schwann del nervio periférico de mono. Esta

observación concuerda con hallazgos anteriores: Kwa y sus colaboradores observaron que el 24% de los pacientes con SGB tenían anticuerpos IgG contra células de Schwann no mielinizantes (106). Vallat también detectó que un porcentaje significativo de pacientes con CIDP y SGB (alrededor del 25%) presentaban reactividad IgG o IgM contra la mielina, y que los patrones de tinción en las células de Schwann eran diversos, lo que sugiere que los autoanticuerpos reconocen diversos antígenos de la mielina (161).

Nuestro estudio también confirma, en una cohorte de SGB bien caracterizada, que los gangliósidos son los antígenos específicos más frecuentes en los pacientes con SGB y que se asocian a variantes específicas de la enfermedad. El valor de las pruebas de anticuerpos antigangliósido en la rutina clínica es controvertido, pero está claro que algunos anticuerpos se asocian a fenotipos clínicos específicos (44). El anticuerpo IgG anti-GQ1b es un marcador de diagnóstico y un anticuerpo patogénico en el SMF, y a menudo se observa reacción cruzada con GT1a (162). Además, los anticuerpos IgG anti-GM1 se asocian a las variantes motora pura (clínica) y AMAN (electrofisiológica). Nuestros resultados, en los que el 80% de los pacientes con SMF tienen anticuerpos anti-GQ1b y el 68,4% de los pacientes motores puros tienen anticuerpos anti-GM1 al inicio del estudio, confirman estas asociaciones. Sin embargo, nuestro estudio carece de poder para encontrar otras asociaciones descritas previamente (anti-GD1b con neuropatía atáxica aguda, anti-GT1a y variante faringo-cérvico-braquial) (163,164) que deberán ser confirmadas en cohortes aún más grandes.

Algunos estudios han observado una correlación entre los anticuerpos IgG anti-GM1 y anti-GD1a con un mal pronóstico en pacientes con SGB (85,151,165,166). En nuestra cohorte de SGB esporádico, los anticuerpos IgG anti-GD1a no se asociaron a un mal pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, nuestros datos confirman que los anticuerpos IgG anti-GM1 son un factor pronóstico independiente que se asocia con un mal pronóstico a 1 año, apoyando que puede ser un marcador de daño axonal a largo plazo. Queda por dilucidar si la presencia de anticuerpos anti-GM1 fijadores del complemento es la causa de esta discapacidad a largo plazo, una cuestión terapéutica importante (que permitiría el uso de inhibidores del complemento en estos pacientes).

Aunque en este estudio analizamos el valor pronóstico de los anticuerpos anti-gangliósido utilizando las medidas de pronóstico tradicionales: incapacidad para caminar ($GDS \geq 3$) a los 6 meses y al año, recientemente hemos utilizado la incapacidad para correr ($GDS \geq 2$) como medida de la presencia de discapacidad residual a largo plazo. En este estudio reciente demostramos que los niveles de sNfL elevados al inicio de la enfermedad se asociaban de forma independiente con la incapacidad para correr a 1 año (76). De acuerdo con estos hallazgos, observamos que al incluir en el modelo la variable "presencia de anticuerpos IgG anti-GM1 en suero", los niveles de sNfL se mantuvieron como un factor pronóstico independiente, mientras que los anticuerpos anti-GM1 no. Estos resultados confirman que los niveles de sNfL son un factor pronóstico que informa mejor sobre el estado de los axones y, en consecuencia, sobre la discapacidad a largo plazo.

Es interesante destacar que no encontramos ningún paciente con anticuerpos anti-nodales/paranodales (CNTN1, NF140, NF186, NF155 y CASPR1) ni en la cohorte española de SGB esporádico ni en la cohorte colombiana de ZIKV-SGB. Aunque estudios previos de otros autores han encontrado algunos pacientes positivos en sus cohortes (99,102,104,105,167), y describen la asociación de anticuerpos anti-nodales/paranodales con neuropatías inflamatorias agresivas frecuentemente mal diagnosticadas como SGB, estos anticuerpos son raros y no podemos descartar la posibilidad de que estén presentes en otros pacientes que nuestras cohortes no pudieron captar.

En la cohorte de ZIKV-SGB analizada también se observó que la respuesta inmunitaria humoral era diversa y heterogénea. En este estudio, en el que sí que se hicieron experimentos de identificación de antígenos concretos, no encontramos ningún antígeno a pesar de que todos estos pacientes compartían una infección prodrómica común.

En consonancia con un estudio reciente hecho en una pequeña cohorte de pacientes con SGB asociado al ZIKV en Brasil (131), observamos un pequeño número de pacientes con SGB con elevados anticuerpos IgG antigangliósidos. Sin embargo, no encontramos una asociación estadísticamente significativa con ninguno de los anticuerpos, apoyando así los resultados de otro reciente estudio del noreste de Brasil (133). En nuestra cohorte, los casos que encontramos pueden representar un subconjunto de pacientes con SGB inducido por el

ZIKV, o simplemente han sido casos de pacientes con SGB de inicio clásico cuyo curso clínico coincidió con infecciones recientes por el ZIKV.

El análisis de la poliproteína del ZIKV mostró que contenía secuencias peptídicas que también se encontraban en proteínas humanas y que se sabe que son objetivos de autoanticuerpos en neuropatías inflamatorias (134). Sin embargo, los autoanticuerpos reactivos contra nervio mostraron una distribución discreta, lo que sugiere que cualquier antigenicidad relacionada con el nervio no es simplemente una consecuencia de la inmunidad humoral hacia los antígenos del ZIKV *per se*.

En el cribado de autoanticuerpos hacia células nerviosas periféricas, observamos una respuesta sorprendentemente heterogénea en los sueros de los pacientes ZIKV-SGB. En general, la reactividad de IgG frente a las células de Schwann fue significativamente mayor, aunque con poca frecuencia, en el grupo de pacientes con ZIKV-SGB en comparación con todos los controles. La reactividad de IgM contra las neuronas de GRD y las células de Schwann también fue significativamente mayor en los pacientes ZIKV-SGB que en el grupo control.

Al emplear técnicas de IP y espectrometría de masas en neuronas de GRD tratadas con suero de pacientes, revelamos una serie de antígenos candidatos relacionados con la membrana de las células de Schwann, la formación de mielina o la adhesión de células neuronales. Sin embargo, no pudimos confirmar la reactividad de ningún antígeno candidato, lo que refuerza las complicaciones en la identificación de antígenos en neuropatías inflamatorias (146).

Una de las limitaciones de los dos estudios es el número de pacientes y controles incluidos. Tenemos grupos pequeños de pacientes con patrones de tinción similares en los que es difícil establecer correlaciones clínico-inmunológicas claras. Otra limitación es que nuestros protocolos están optimizados para la identificación de proteínas y no para lípidos o glúcidos. Además, otros factores no controlados podrían haber influido en la heterogeneidad de los patrones de tinción (tratamiento, comorbilidades...), y deberían ser evaluados en cohortes más amplias. En el caso de la búsqueda de antígenos en los pacientes ZIKV-SGB, es posible que ciertos antígenos proteicos no fueran detectables, ya sea debido

a una mala inmunoprecipitación o a la falta de representación en la base de datos de péptidos utilizada para compilar nuestra lista de antígenos candidatos.

Todavía no está claro si los autoanticuerpos observados en las cohortes de SGB estudiadas surgen de un proceso de mimetismo molecular o de una activación inespecífica y policlonal de células B preexistentes. La ausencia general de patrones comunes sugiere lo segundo, pero el proceso de mimetismo molecular descrito en el SGB asociado a antigangliósidos apoya la primera hipótesis. Curiosamente, en este cribado no encontramos diferencias claras en los patrones de reactividad entre los pacientes con SGB esporádico con o sin anticuerpos antigangliósido, pero observamos en ambos grupos una mayor cantidad de pacientes que tiñen estructuras nerviosas que en los controles. Estos resultados sugieren que la respuesta inmunitaria en el SGB no se limita a la producción de anticuerpos antigangliósido, sino que también se dirige a otras estructuras nerviosas periféricas. Esta observación puede reflejar la presencia de una reactivación policlonal, no impulsada por el antígeno, de un repertorio preexistente que en algunos pacientes incluye gangliósidos; o la activación concomitante de células B inespecíficas además de la respuesta específica al antígeno impulsada por los gangliósidos.

Aunque en los pacientes con SGB post-infección por ZIKV la reactividad frente a neuronas sea significativamente mayor en que en la cohorte de SGB esporádico, nuestros hallazgos muestran una reactividad igualmente heterogénea de IgG e IgM a antígenos relacionados con el nervio. La estrecha definición de la cohorte de ZIKV-SGB, en la que todos los pacientes se asociaron al mismo antecedente infeccioso, sugiere que la heterogeneidad de las respuestas inmunitarias humorales en el SGB puede ser una característica central de la enfermedad y no necesariamente debida a la heterogeneidad de las cohortes de pacientes.

7. CONCLUSIONES

- El SGB es una neuropatía inmunomediada ampliamente heterogénea en la que los pacientes presentan múltiples reactividades de tipo IgG e IgM contra los principales tipos celulares del nervio periférico.
- Los pacientes con SGB asociado al ZIKV también presentan una heterogeneidad de la respuesta inmunitaria humoral a pesar de tener un antecedente infeccioso común.
- Los gangliósidos son los antígenos diana más frecuentes en el repertorio de autoanticuerpos del SGB y tienen un valor predictivo del pronóstico a largo plazo.
- Los patrones de tinción específicos observados en los pacientes con SGB sugieren que nuevos experimentos de identificación de antígenos podrían dilucidar nuevas reactividades de autoanticuerpos clínicamente relevantes.

8. LÍNEAS DE FUTURO

Los estudios de cribado realizados en los pacientes con SGB ponen de manifiesto la heterogeneidad de la respuesta inmunitaria hacia diferentes células del nervio periférico. A pesar de los esfuerzos realizados en encontrar los antígenos diana de esta respuesta en los pacientes con SGB post-infección por el virus Zika, no hemos podido validar ninguno de ellos.

En futuros estudios, trataremos de identificar los anticuerpos responsables de las reactividades observadas en la cohorte española de SGB (en la que todavía no se han realizado técnicas de inmunoprecipitación). Para ello, usaremos como sustrato de IP las células nerviosas de origen humano (neuronas derivadas de neuroblastoma) usadas en el cribado; ya que podrían ser más útiles que las neuronas de GRD murinas usadas en las IP de los pacientes ZIKV-SGB.

Además, intentaremos usar nuevas técnicas experimentales que nos permitan salvar las limitaciones que hemos observado en el transcurso de nuestros experimentos, como el análisis de glúcidos o lípidos como posibles candidatos a antígenos, o el uso de técnicas de cribado de alto rendimiento mediante *arrays* antigénicos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. R. R. Neurología. Texto y atlas. Ed. Médica Panamericana; 2011.
2. Rigoard P. Atlas of Anatomy of the peripheral nerves. Atlas of Anatomy of the peripheral nerves. 2020.
3. 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(May):1–17.
4. Bilbao JM, Schmidt RE. Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy, second edition. *Biopsy Diagnosis of Peripheral Neuropathy, Second Edition.* 2015. 1–486 p.
5. Marani EE, Lakke EAJF. Peripheral Nervous System Topics [Internet]. Third Edit. *The Human Nervous System.* Elsevier; 2012. 82–140 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374236-0.10004-5>
6. Griffin JW, Thompson WJ. Biology and pathology of nonmyelinating schwann cells. *Glia.* 2008;56(14):1518–31.
7. Carroll SL. The molecular and morphologic structures that make saltatory conduction possible in peripheral nerve. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017;76(4):255–7.
8. Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, et al. Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron.* 2005;47(2):215–29.
9. Rasband MN, Peles E. Mechanisms of node of Ranvier assembly. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2021;22(1):7–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41583-020-00406-8>
10. Salzer JL, Brophy PJ, Peles E. Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia.* 2008;56(14):1532–40.
11. Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, Barbin G, Gunn-Moore F, Denisenko-Nehrbass N, et al. Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglia junction. *Curr Biol.* 2002;12(3):217–20.
12. Rios JC, Melendez-Vasquez C V., Einheber S, Lustig M, Grumet M, Hemperly J, et al. Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci.* 2000;20(22):8354–64.
13. Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, et al. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of

- myelinated fibers. *J Cell Biol.* 2003;162(6):1161–72.
14. Querol L, Devaux J, Rojas-Garcia R, Illa I. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: Diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2017;13(9):533–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2017.84>
 15. Kieseier BC, Hartung HP, Wiendl H. Immune circuitry in the peripheral nervous system. *Curr Opin Neurol.* 2006;19(5):437–45.
 16. Gold R, Archelos JJ, Hartung HP. Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system. *Brain Pathol.* 1999;9(2):343–60.
 17. Mäurer M, Gold R. Animal models of immune-mediated neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2002;15(5):617–22.
 18. Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(2):208–12.
 19. Pollard JD, Westland KW, Harvey GK, Jung S, Bonner J, Spies JM, et al. Activated T cells of nonneural specificity open the blood-nerve barrier to circulating antibody. *Ann Neurol.* 1995;37(4):467–75.
 20. Kieseier BC, Mathey EK, Sommer C, Hartung HP. Immune-mediated neuropathies. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-018-0027-2>
 21. Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, et al. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(31):11404–9.
 22. Spies JM, Westland KW, Bonner JG, Pollard JD. Intraneural activated t cells cause focal breakdown of the blood-nerve barrier. *Brain.* 1995;118(4):857–68.
 23. Previtali SC, Archelos JJ, Hartung HP. Expression of integrins in experimental autoimmune neuritis and guillain-barré syndrome. *Ann Neurol.* 2004;44(4):611–21.
 24. Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, Kieseier BC, Hartung HP, Pfister HW. CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) in inflammatory diseases of the nervous system. *J Neuroimmunol.* 2003;137(1–2):210–7.
 25. Kieseier BC, Tani M, Mahad D, Oka N, Ho T, Woodroffe N, et al. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: A central role for IP-10.

- Brain. 2002;125(4):823–34.
26. D.Leppert, P.Hughes, S-Huber, B.Erne, C.Grygar, G.Said, et al. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology*. 1999;53(1).
 27. Meyer Zu Horste G, Heidenreich H, Lehmann HC, Ferrone S, Hartung HP, Wiendl H, et al. Expression of antigen processing and presenting molecules by Schwann cells in inflammatory neuropathies. *Glia*. 2010;58(1):80–92.
 28. Hörste GMZ, Hu W, Hartung HP, Lehmann HC, Kieseier BC. The immunocompetence of Schwann cells. *Muscle and Nerve*. 2008;37(1):3–13.
 29. Pollard JD, McCombe PA, Baverstock J, Gatenby PA, McLeod JG. Class II antigen expression and T lymphocyte subsets in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol*. 1986;13(2):123–34.
 30. Pollard JD, Baverstock J, McLeod JG. Class II antigen expression and inflammatory cells in the guillain-barré syndrome. *Ann Neurol*. 1987;21(4):337–41.
 31. E.K.Mathey, Pollard JD, Armati PJ. TNF α , IFN γ and IL-2 expression in CIDP sural nerve biopsies. *J Neurol Sci*. 1999;163(1):47–52.
 32. Taskinen HS, Olsson T, Bucht A, Khademi M, Svelander L, Røyttä M. Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN- γ , IL-10 and TNF- α mRNA. *J Neuroimmunol*. 2000;102(1):17–25.
 33. Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*. 2001;64(2):109–27.
 34. Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008;4(10):557–67.
 35. Martín-Aguilar L, Pascual-Goñi E, Querol L. Autoantibodies in immune-mediated inflammatory neuropathies. *Med Clin (Barc)*. 2019;153(9):360–7.
 36. Querol L, Devaux J, Rojas-Garcia R, Illa I. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: Diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(9):533–47.
 37. O’Hanlon GM, Plomp JJ, Chakrabarti M, Morrison I, Wagner ER, Goodyear CS, et al. Anti-GQ1b ganglioside antibodies mediate complement-dependent destruction of the motor nerve terminal. *Brain*. 2001;124(5):893–906.

38. Kusunoki S, Hitoshi S, Kaida KI, Murayama S, Kanazawa I. Degeneration of rabbit sensory neurons induced by passive transfer of anti-GD1b antiserum. *Neurosci Lett*. 1999;273(1):33–6.
39. Manso C, Illa I, Devaux JJ, Manso C, Querol L, Lleixà C, et al. Anti – neurofascin-155 IgG4 antibodies prevent paranodal complex formation in vivo Find the latest version : Anti – neurofascin-155 IgG4 antibodies prevent paranodal complex formation in vivo. 2019;129(6):2222–36.
40. Manso C, Querol L, Mekaouche M, Illa I, Devaux JJ. Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects. *Brain*. 2016;
41. Schafflick D, Kieseier BC, Wiendl H, Meyer zu Horste G. Novel pathomechanisms in inflammatory neuropathies. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):1–17.
42. Esposito S, Longo MR. Guillain–Barré syndrome. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2017;16(1):96–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2016.09.022>
43. Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW. Population incidence of Guillain-Barré Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. 2011;36(2):123–33.
44. Leonhard SE, Mandarakas MR, Gondim FAA, Bateman K, Ferreira MLB, Cornblath DR, et al. Diagnosis and management of Guillain–Barré syndrome in ten steps. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2019;15(11):671–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0250-9>
45. Willison HJ, Veitch J, Paterson G, Kennedy PGE. Miller Fisher syndrome is associated with serum antibodies to GQ1b ganglioside. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(2):204–6.
46. Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* (London, England). 2016 Feb;
47. Jacobs BC, Rothbarth P h., Meché FG van der, Herbrink P, Schmitz PI, Klerk MA de, et al. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. *Neurology*. 1998;51(4):1110–5.
48. Rinaldi S. ´ syndrome Update on Guillain-Barr e. 2013;112:99–112.
49. Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome. *Lancet*. 2016;388(10045):717–27.

50. McKhann GM, Griffin JW, Cornblath DR, Mellits ED, Fisher RS, Quaskey SA. Plasmapheresis and guillain-barré syndrome: Analysis of prognostic factors and the effect of plasmapheresis. *Ann Neurol*. 1988;23(4):347–53.
51. El A, Provost T. Guillain-Barre syndrome with high- dose gammaglobulin. 1988;(October):1639–42.
52. Shahrizaila N, Lehmann HC, Kuwabara S. Guillain-Barré syndrome. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2021;6736(21). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33647239>
53. Doets AY, Verboon C, van den Berg B, Harbo T, Cornblath DR, Willison HJ, et al. Regional variation of Guillain-Barré syndrome. *Brain*. 2018;141(10):2866–77.
54. van Koningsveld R, Steyerberg EW, Hughes RA, Swan A V., van Doorn PA, Jacobs BC. A clinical prognostic scoring system for Guillain-Barré syndrome. *Lancet Neurol*. 2007;6(7):589–94.
55. Sejvar JJ, Kohl KS, Gidudu J, Amato A, Bakshi N, Baxter R, et al. Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*. 2011;29(3):599–612.
56. Van Den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, Van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2014;10(8):469–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.121>
57. Yuki N. Fisher syndrome and Bickerstaff brainstem encephalitis (Fisher-Bickerstaff syndrome). *J Neuroimmunol* [Internet]. 2009;215(1–2):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.05.020>
58. Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Kanazawa I. Serum anti-gq1b igg antibody is associated with ophthalmoplegia in miller fisher syndrome and guillain-barré syndrome: Clinical and immunohistochemical studies. *Neurology*. 1993;43(10):1911–7.
59. Van Den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, Van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2014;10(8):469–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.121>
60. Pradhan RR, Yadav SK, Yadav SK. Pharyngeal–Cervical–Brachial variant of Guillian–Barre Syndrome in Children. *Cureus*. 2020;12(2):6–12.
61. Kimachi T, Yuki N, Kokubun N, Yamaguchi S, Wakerley BR. Paraparetic Guillain-Barré

- syndrome: Nondemyelinating reversible conduction failure restricted to the lower limbs. *Muscle Nerve*. 2017;55(2):281–5.
62. Oladiran O, Shi XQ, Yang M, Fournier S, Zhang J. Inhibition of TLR4 signaling protects mice from sensory and motor dysfunction in an animal model of autoimmune peripheral neuropathy. 2021;1–17.
 63. Berciano J. Axonal degeneration in Guillain–Barré syndrome: a reappraisal. *J Neurol* [Internet]. 2020;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10034-y>
 64. Berciano J. Spinal nerve involvement in early Guillain-Barré syndrome: The Haymaker and Kernohan’s legacy. *J Neurol Sci* [Internet]. 2017;382(September):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2017.09.017>
 65. Asbury AK, G. Arnason B. The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis. 1969.
 66. Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, Ho TW, Cornblath DR, McKhann GM, et al. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*. 1996;39(5):625–35.
 67. Brostoff SW, Levit S, Powers JM. Induction of experimental allergic neuritis with a peptide from myelin P2 basic protein. *Nature*. 1977;268.
 68. Gabriel CM, Hughes RAC, Moore SE, Smith KJ, Walsh FS. Induction of experimental autoimmune neuritis with peripheral myelin protein-22. *Brain*. 1998;121(10):1895–902.
 69. Saida T, Saida K, Dorfman SH, Silberberg DH, Sumner AJ, Manning MC, et al. Experimental allergic neuritis induced by sensitization with galactocerebroside. *Science* (80-). 1979;204(4397):1103–6.
 70. Hafer-Macko C, Hsieh ST, Yan Li C, Ho TW, Sheikh K, Cornblath DR, et al. Acute motor axonal neuropathy: An antibody-mediated attack on axolemma. *Ann Neurol*. 1996;40(4):635–44.
 71. Kuwabara S, Yuki N. Axonal Guillain-Barré syndrome: Concepts and controversies. *Lancet Neurol* [Internet]. 2013;12(12):1180–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70215-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70215-1)
 72. Uncini A, Vallat JM. Autoimmune nodo-paranodopathies of peripheral nerve: The concept is gaining ground. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(6):627–35.

73. Griffin JW, Li CY, Macko C, Ho TW, Hsieh ST, Xue P, et al. Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the Guillain-Barré syndrome. *J Neurocytol.* 1996;25(1):33–51.
74. Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, et al. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol.* 2001;49(6):712–20.
75. Capodivento G, de Michelis C, Carpo M, Fancellu R, Schirinzi E, Severi D, et al. CSF sphingomyelin: A new biomarker of demyelination in the diagnosis and management of CIDP and GBS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020;(November 2019):1–8.
76. Martín-Aguilar L, Camps-Renom P, Lleixà C, Pascual-Goñi E, Díaz-Manera J, Rojas-García R, et al. Serum neurofilament light chain predicts long-term prognosis in Guillain-Barré syndrome patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020;1–8.
77. Berciano J, Sedano MJ, Pelayo-Negro AL, García A, Orizaola P, Gallardo E, et al. Proximal nerve lesions in early Guillain–Barré syndrome: implications for pathogenesis and disease classification. *J Neurol.* 2017;264(2):221–36.
78. Hughes RAC, Rees JH. Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis.* 1997;176(6 SUPPL.):92–8.
79. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet [Internet].* 2016;387(10027):1531–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
80. Van Den Berg B, Van Der Eijk AA, Pas SD, Hunter JG, Madden RG, Tio-Gillen AP, et al. Guillain-Barré syndrome associated with preceding hepatitis E virus infection. *Neurology.* 2014;82(6):491–7.
81. The spectrum of antecedent infections in GBS. A case-control study.
82. Keddie S, Pakpoor J, Mousele C, Pipis M, Pedro M, Foster M, et al. Epidemiological and cohort study finds no association between COVID-19 and Guillain-Barré syndrome. 0:2–25.
83. Salmon DA, Proschan M, Forshee R, Gargiullo P, Bleser W, Burwen DR, et al. Association between Guillain-Barré syndrome and influenza A (H1N1) 2009 monovalent inactivated vaccines in the USA: A meta-analysis. *Lancet [Internet].* 2013;381(9876):1461–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62189-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62189-8)

84. Restrepo-Jiménez P, Rodríguez Y, González P, Chang C, Gershwin ME, Anaya JM. The immunotherapy of Guillain-Barré syndrome. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2018;18(6):619–31. Available from: <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1468885>
85. Van Koningsveld R, Schmitz PIM, Ang CW, Groen J, Osterhaus ADME, Van Der Meché FGA, et al. Infections and course of disease in mild forms of Guillain-Barré syndrome. *Neurology*. 2002;58(4):610–4.
86. Yuki N. Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barré and Fisher syndromes. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(1):29–37.
87. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RAC. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré Syndrome. *N Engl J Med*. 1995;333:1374–9.
88. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T. Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis. *Neurology*. 1990;40(12).
89. Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, et al. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré Syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *JExpMed*. 1993;178(November):2–6.
90. Godschalk PCR, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Wim Ang C, Glerum J, et al. The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114(11):1659–65.
91. Willison HJ. Anti-ganglioside antibodies in peripheral nerve pathology. *Methods Mol Biol*. 2018;1804:173–88.
92. M.Green D. Advances in the management of Guillain-Barré Syndrome. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2002;2:541–8.
93. Kuwabara S, Yuki N, Koga M, Hattori T, Matsuura D, Miyake M, et al. IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*. 1998;44(2):202–8.
94. Gong Y, Tagawa Y, Lunn MPT, Laroy W, Heffer-Laue M, Li CY, et al. Localization of major gangliosides in the PNS: Implications for immune neuropathies. *Brain*. 2002;125(11):2491–506.
95. Susuki K, Rasband MN, Tohyama K, Koibuchi K, Okamoto S, Funakoshi K, et al. Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J Neurosci*. 2007;27(15):3956–67.

96. McGonigal R, Rowan EG, Greenshields KN, Halstead SK, Humphreys PD, Rother RP, et al. Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain*. 2010;133(7):1944–60.
97. He L, Zhang G, Liu W, Gao T, Sheikh KA. Anti-ganglioside antibodies induce nodal and axonal injury via Fc γ receptor-mediated inflammation. *J Neurosci*. 2015;35(17):6770–85.
98. Clark AJ, Kaller MS, Galino J, Willison HJ, Rinaldi S, Bennett DLH. Co-cultures with stem cell-derived human sensory neurons reveal regulators of peripheral myelination
Abbreviations: iPSC = induced pluripotent stem cell; MOI = multiplicity of infection; TIINRG1 = type III neuregulin-1. 2017;898–913. Available from:
<https://academic.oup.com/brain/article-abstract/140/4/898/2998972>
99. Devaux JJ, Odaka M, Yuki N. Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barré syndrome. *J Peripher Nerv Syst*. 2012;17(1):62–71.
100. King J, Ng M, Olsson T, Linington C, Prüss H, Schwab JM, et al. Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. 2012;
101. Doppler K, Appeltshauer L, Villmann C, Martin C, Peles E, Krämer HH, et al. Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain*. 2016;139(10):2617–30.
102. Appeltshauer L. Anti-paranodal antibodies and IgG subclasses in acute autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2020;
103. Pascual-Goñi E, Fehmi J, Lleixa C, Martí L, Sommer C, Radunovic A, et al. Antibodies to the Caspr1/contactin-1 complex in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain*. 2021;1183–96.
104. Stengel H, Vural A, Brunder AM, Heinius A, Appeltshauer L, Fiebig B, et al. Anti-pan-neurofascin IgG3 as a marker of fulminant autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol NeuroInflammation*. 2019;6(5):1–11.
105. Doppler K, Appeltshauer L, Villmann C, Martin C, Peles E, Krämer HH, et al. Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain*. 2016;139(10):2617–30.
106. Kwa MSG, Van Schaik IN, De Jonge RR, Brand A, Kalaydjieva L, Van Belzen N, et al. Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies. *Brain*. 2003;126(2):361–75.

107. Vallat JM, Mathis S, Vegezzi E, Richard L, Duchesne M, Gallouedec G, et al. Antibody- and macrophage-mediated segmental demyelination in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: clinical, electrophysiological, immunological and pathological correlates. *Eur J Neurol*. 2020;27(4):692–701.
108. Sawai S, Satoh M, Mori M, Misawa S, Sogawa K, Kazami T, et al. Moesin is a possible target molecule for cytomegalovirus-related Guillain-Barré syndrome. *Neurology*. 2014;83(2):113–7.
109. Yonekura K, Yokota SI, Tanaka S, Kubota H, Fujii N, Matsumoto H, et al. Prevalence of anti-heat shock protein antibodies in cerebrospinal fluids of patients with Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol*. 2004;156(1–2):204–9.
110. Helgeland G, Petzold A, Hoff JM, Gilhus NE, Plant GT, Romi FR. Anti-Heat Shock Protein 70 antibody levels are increased in myasthenia gravis and Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2010;225(1–2):180–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.04.024>
111. Musso D, J.Gluber D. Zika virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29:487–524.
112. Dick GWA. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46(5):521–34.
113. Simpson DIH. Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1964;58:335–7.
114. Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K, Hai R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017;6(3):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2016.141>
115. Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Castillo-Medina LF, Rodríguez Y, Pacheco Y, Halstead S, et al. Autoimmune neurological conditions associated with zika virus infection. *Front Mol Neurosci*. 2018;11(April).
116. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;360(24):2536–43.
117. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastãre S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by guillain-barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* [Internet]. 2014;19(9):7–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>

118. Santos T dos, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, Oliveira WK de, et al. Correspondence Zika Virus and the Guillain – Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *N Engl J Med*. 2016;375(16):1598–601.
119. Keegan LT, Lessler J, Johansson MA. Quantifying Zika: Advancing the Epidemiology of Zika with Quantitative Models. *J Infect Dis*. 2017;216(March):S884–90.
120. Koike H, Katsuno M. Emerging infectious diseases, vaccines and Guillain–Barré syndrome. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2021;12(3):165–70.
121. Wikan N, Smith DR. Zika virus: History of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016;16(7):e119–26. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30010-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30010-X)
122. Freitas DA, Souza-Santos R, Carvalho LMA, Barros WB, Neves LM, Brasil P, et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLoS One*. 2020;15(12 December):1–27.
123. Parra B, Lizarazo J, Jiménez-Arango JA, Zea-Vera AF, González-Manrique G, Vargas J, et al. Guillain–Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *N Engl J Med*. 2016;375(16):1513–23.
124. Da Silva IRF, Frontera JA, De Filippis AMB, Do Nascimento OJM. Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. *JAMA Neurol*. 2017;74(10):1190–8.
125. S.Muñoz L, Parra B, A.Pardo C. Neurological implications of Zika virus infection in adults. *J Infect Dis*. 2018;217(2):257–62.
126. Arias A, Torres-Tobar L, Hernández G, Paipilla D, Palacios E, Torres Y, et al. Guillain-Barré syndrome in patients with a recent history of Zika in Cúcuta, Colombia: A descriptive case series of 19 patients from December 2015 to March 2016. *J Crit Care* [Internet]. 2017;37(December 2015):19–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2016.08.016>
127. Uncini A, Shahrizaila N, Kuwabara S. Zika virus infection and Guillain-Barré syndrome: A review focused on clinical and electrophysiological subtypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(3):266–71.
128. Nascimento OJM, Da Silva IRF. Guillain-Barré syndrome and Zika virus outbreaks. *Curr Opin Neurol*. 2017;30(5):500–7.
129. Muñoz LS, Barreras P, Pardo CA. Zika Virus-Associated Neurological Disease in the Adult:

- Guillain-Barré Syndrome, Encephalitis, and Myelitis. *Semin Reprod Med.* 2016;34(5):273–9.
130. Lynch RM, Mantus G, Encinales L, Pacheco N, Li G, Porras A, et al. Augmented zika and dengue neutralizing antibodies are associated with guillain-Barré syndrome. *J Infect Dis.* 2019;219(1):26–30.
 131. Rivera-Correa J, De Siqueira IC, Mota S, Do Rosário MS, De Jesus PAP, Carlos Jr. Alcantara L, et al. Anti-ganglioside antibodies in patients with Zika virus infection-associated Guillain-Barré Syndrome in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(9):1–13.
 132. Anaya JM, Rodríguez Y, Monsalve DM, Vega D, Ojeda E, González-Bravo D, et al. A comprehensive analysis and immunobiology of autoimmune neurological syndromes during the Zika virus outbreak in Cúcuta, Colombia. *J Autoimmun.* 2017;77:123–38.
 133. Leonhard SE, Halstead S, Lant SB, Militão de Albuquerque M de FP, de Brito CAA, de Albuquerque LBB, et al. Guillain-Barré syndrome during the Zika virus outbreak in Northeast Brazil: An observational cohort study. *J Neurol Sci.* 2021;420(October 2020).
 134. Lucchese G, Kanduc D. Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. *Autoimmun Rev [Internet].* 2016;15(8):801–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2016.03.020>
 135. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol [Internet].* 2016;(June):1–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3515>
 136. Hossein F. An overview of the current medical literature on Zika virus. *Biophys Rev.* 2020;12(5):1133–8.
 137. Correa ARV, Berbel ACER, Papa MP, De Moraes ATS, Peçanha LMT, De Arruda LB. Dengue virus directly stimulates Polyclonal B cell activation. *PLoS One.* 2015;10(12):1–20.
 138. Oh Y, Zhang F, Wang Y, Lee EM, Choi IY, Lim H, et al. Zika virus directly infects peripheral neurons and induces cell death. *Nat Neurosci [Internet].* 2017;20(9):1209–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4612>
 139. Volpi VG, Pagani I, Ghezzi S, Iannaccone M, D'antonio M, Vicenzi E. Zika virus replication in dorsal root ganglia explants from interferon receptor1 knockout mice causes myelin

- degeneration. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–9.
140. Bell TM, Field EJ, Narang HK. Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1971;35(2–3):183–93.
141. Zhang N, Zhang N, Qin CF, Liu X, Shi L, Xu Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2016;19(1):120–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>
142. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2016;19(2):258–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014>
143. Jacobs BC, van den Berg B, Verboon C, Chavada G, Cornblath DR, Gorson KC, et al. International Guillain-Barré Syndrome Outcome Study: protocol of a prospective observational cohort study on clinical and biological predictors of disease course and outcome in Guillain-Barré syndrome. *J Peripher Nerv Syst*. 2017 Jun;22(2):68–76.
144. Van den Bergh PYK, Hadden RDM, Bouche P, Cornblath DR, Hahn A, Illa I, 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 Mar;17(3):356–63.
145. Hughes RAC, Newsom-Davis J, Perkin G, Pierce J. Controlled trial of prednisolone in acute polyneuropathy. *Lancet (London, England)*. 1978;750–3.
146. Querol L, Siles AM, Alba-Rovira R, Jáuregui A, Devaux J, Faivre-Sarrailh C, et al. Antibodies against peripheral nerve antigens in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–9.
147. Willison HJ, Veitch J, Swan A V., Baumann N, Comi G, Gregson NA, et al. Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. Vol. 6, *European Journal of Neurology*. 1999. p. 71–7.
148. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W566–70.
149. Hiraga A, Mori M, Ogawara K, Kojima S, Kanesaka T, Misawa S, et al. Recovery patterns and long term prognosis for axonal Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg*

- Psychiatry. 2005;76(5):719–22.
150. Kuwabara S, Mori M, Ogawara K, Hattori T, Yuki N. Indicators of rapid clinical recovery in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;70(4):560–2.
 151. Yamagishi Y, Kuwahara M, Suzuki H, Sonoo M, Kuwabara S, Yokota T, et al. Serum IgG anti- - GD1a antibody and mEGOS predict outcome in Guillain- - Barré syndrome. 2020;1–4.
 152. Hadden RDM, Karch H, Hartung HP, Zielasek J, Weissbrich B, Schubert J, et al. Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barré syndrome. *Neurology*. 2001;56(6):758–65.
 153. Lécuyer MA, Saint-Laurent O, Bourbonnière L, Larouche S, Larochelle C, Michel L, et al. Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(4):E524–33.
 154. Faizan MI, Abdullah M, Ali S, Naqvi IH, Ahmed A, Parveen S. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirology*. 2017;59(3):152–8.
 155. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep*. 2017;18(2):324–33.
 156. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Martinez-Hernandez E, Diaz-Manera J, Suárez-Calvet X, et al. Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*. 2013;73(3):370–80.
 157. Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Ménager C, Kawano Y, Matsuo N, et al. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci*. 2001;4(8):781–2.
 158. Coman I, Barbin G, Charles P, Zalc B, Lubetzki C. Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination and remyelination. *J Neurol Sci*. 2005;233(1–2):67–71.
 159. Carisey A, Ballestrem C. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur J Cell Biol [Internet]*. 2011;90(2–3):157–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.06.007>
 160. Beppu M, Sawai S, Satoh M, Mori M, Kazami T, Misawa S, et al. Autoantibodies against vinculin in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol [Internet]*. 2015;287:9–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.07.012>

161. Vallat JM, Mathis S, Vegezzi E, Richard L, Duchesne M, Gallouedec G, et al. Antibody- and macrophage-mediated segmental demyelination in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: clinical, electrophysiological, immunological and pathological correlates. *Eur J Neurol*. 2020;27(4):692–701.
162. Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Mini-review. *J Neuroimmunol*. 2010;223(1–2):5–12.
163. Pan CL, Yuki N, Koga M, Chiang MC, Hsieh ST. Acute sensory ataxic neuropathy associated with monospecific anti-GD1B IgG antibody. *Neurology*. 2001;57(7):1316–8.
164. Koga M, Yuki N, Ariga T, Morimatsu M, Hirata K. Is IgG anti-GT1a antibody associated with pharyngeal-cervical-brachial weakness or oropharyngeal palsy in Guillain-Barre syndrome? *J Neuroimmunol*. 1998;86(1):74–9.
165. Rajabally YA, Uncini A. Outcome and its predictors in Guillaine-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(7):711–8.
166. Kuwabara S, Mori M, Ogawara K, Hattori T, Oda S, Koga M, et al. Intravenous immunoglobulin therapy for Guillain-Barré syndrome ith IgG anti-GM1 antibody. *Muscle Nerve*. 2001;(January):54–8.
167. Prüss H, Schwab JM, Derst C, Görtzen A, Veh RW. Neurofascin as target of autoantibodies in Guillain-Barré syndrome. *Brain*. 2011;134(5):1–2.

10. ANEXO

RESEARCH

Open Access



Autoantibody screening in Guillain–Barré syndrome

Cinta Lleixà^{1†}, Lorena Martín-Aguilar^{1†}, Elba Pascual-Goñi¹, Teresa Franco², Marta Caballero¹, Noemí de Luna^{1,3}, Eduard Gallardo^{1,3}, Xavier Suárez-Calvet^{1,3}, Laura Martínez-Martínez², Jordi Díaz-Manera^{1,3}, Ricard Rojas-García^{1,3}, Elena Cortés-Vicente^{1,3}, Joana Turón^{1,3}, Carlos Casasnovas^{3,5,6}, Christian Homedes⁵, Gerardo Gutiérrez-Gutiérrez⁷, María Concepción Jimeno-Montero⁷, José Berciano^{4,8}, María José Sedano-Tous⁸, Tania García-Sobrino⁹, Julio Pardo-Fernández⁹, Celedonio Márquez-Infante¹⁰, Iñigo Rojas-Marcos¹¹, Ivonne Jericó-Pascual¹², Eugenia Martínez-Hernández^{3,13}, Germán Morís de la Tassa¹⁴, Cristina Domínguez-González^{3,15}, Cándido Juárez², Isabel Illa^{1,3} and Luis Querol^{1,3*}

Abstract

Background: Guillain–Barré syndrome (GBS) is an acute inflammatory neuropathy with a heterogeneous presentation. Although some evidences support the role of autoantibodies in its pathogenesis, the target antigens remain unknown in a substantial proportion of GBS patients. The objective of this study is to screen for autoantibodies targeting peripheral nerve components in Guillain–Barré syndrome.

Methods: Autoantibody screening was performed in serum samples from all GBS patients included in the International GBS Outcome study by 11 different Spanish centres. The screening included testing for anti-ganglioside antibodies, anti-nodo/paranodal antibodies, immunocytochemistry on neuroblastoma-derived human motor neurons and murine dorsal root ganglia (DRG) neurons, and immunohistochemistry on monkey peripheral nerve sections. We analysed the staining patterns of patients and controls. The prognostic value of anti-ganglioside antibodies was also analysed.

Results: None of the GBS patients ($n = 100$) reacted against the nodo/paranodal proteins tested, and 61 (61%) were positive for, at least, one anti-ganglioside antibody. GBS sera reacted strongly against DRG neurons more frequently than controls both with IgG (6% vs 0%; $p = 0.03$) and IgM (11% vs 2.2%; $p = 0.02$) immunodetection. No differences were observed in the proportion of patients reacting against neuroblastoma-derived human motor neurons. Reactivity against monkey nerve tissue was frequently detected both in patients and controls, but specific patterns were only detected in GBS patients: IgG from 13 (13%) patients reacted strongly against Schwann cells. Finally, we confirmed that IgG anti-GM1 antibodies are associated with poorer outcomes independently of other known prognostic factors.

*Correspondence: lquerol@santpau.cat

[†]Cinta Lleixà and Lorena Martín-Aguilar have contributed equally to this work

¹Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Conclusion: Our study confirms that (1) GBS patients display a heterogeneous repertoire of autoantibodies targeting nerve cells and structures; (2) gangliosides are the most frequent antigens in GBS patients and have a prognostic value; (3) further antigen-discovery experiments may elucidate other potential antigens in GBS.

Keywords: Guillain–Barré syndrome (GBS), Autoantibodies, Anti-ganglioside, Neurons, Prognosis

Background

Guillain–Barré syndrome (GBS) is an acute inflammatory neuropathy with a heterogeneous presentation that includes diverse clinical variants [1–3]. Diagnosis is based on clinical criteria; diagnostic biomarkers are not available for most patients [4]. The exact immunopathogenic mechanisms of GBS are relatively unknown, but it is considered a paradigmatic post-infectious autoimmune disease [5]. Diverse mechanisms, including humoral and cellular immune responses, autoantibodies and complement, activated macrophages and lymphocytes, have been implicated in GBS pathogenesis [6, 7].

Anti-ganglioside antibodies are detected in up to half of GBS patients. These autoantibodies arise via microbial molecular mimicry [8] and the association of specific anti-ganglioside antibody reactivities and specific disease variants is well-established in the literature [9, 10], particularly the association of anti-GM1 [11] and GQ1b [12] antibodies with the pure motor and Miller Fisher syndrome (MFS) variants of GBS, respectively. In addition, the presence of antibodies targeting the GM1 [11] or GD1a [13, 14] gangliosides has also been associated with GBS prognosis. Antibodies against nodal and paranodal proteins (neurofascin 140/186 [15] -NF140/186-, neurofascin 155 [16, 17] -NF155-, contactin-associated protein 1 [18, 19] -CASPR1-, and contactin 1 [19] -CNTN1-) have also been described in patients diagnosed of GBS. However, the target antigens remain unknown in a substantial proportion of GBS patients, particularly of the acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (AIDP) variant, the most frequent in patients of European ancestry.

Considering the broad clinical and epidemiological spectrum of GBS, the diverse infectious triggers and the T-cell independent nature of the immune reaction leading to the appearance of autoantibodies [20], we hypothesized that a broad repertoire of autoantibodies targeting diverse nerve components may be causing nerve pathology in GBS. This study aims to (1) screen for autoantibodies against known antigens; (2) screen for antibodies against human and rodent nerve cells and monkey nerve tissue; (3) describe the diversity of staining patterns and (4) perform clinical–immunological correlations, in a well-characterized GBS cohort.

Materials and methods

Patients and controls

Serum samples from 100 GBS patients included in the Spanish cohort of the International GBS Outcome study (IGOS) [21] were used in this screening. The IGOS is a multicentre, prospective, observational cohort study that investigates factors that determine and predict the clinical course, subtype and outcome of GBS [22]; including patients fulfilling diagnostic criteria of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) [1] or Miller Fisher syndrome (MFS) and other variants of GBS [3, 23]. Patients from the Spanish cohort were enrolled between February 2013 and January 2020. All patients fulfilled diagnostic criteria for GBS and were included within 2 weeks from onset of weakness. Serum samples were aliquoted and stored at -80°C until needed. In this study, we used serum samples extracted at baseline. Sixty-two (62%) of the baseline samples analysed were collected before starting treatment.

Clinical variants were defined as sensorimotor, pure motor, pure sensory, Miller Fisher syndrome (MFS) and ataxic. Nerve conduction studies results were classified as acute inflammatory demyelinating polyneuropathy (AIDP), acute motor axonal neuropathy (AMAN), acute motor-sensory axonal neuropathy (AMSAN), equivocal or normal. The outcome of all patients with GBS at 6 months and 1 year from disease onset were assessed using the GBS disability score (GDS), a widely accepted system for evaluating the functional ability of patients [24]. Patients unable to walk independently (≥ 3) at 6 months were defined as having a poor outcome in this study.

Additionally, serum samples from a control group ($n=90$) including 45 healthy controls and 45 patients with other neuromuscular disorders [23 amyotrophic lateral sclerosis (ALS), 22 Charcot–Marie–Tooth (CMT)] were included.

Autoantibody screening protocol

Autoantibody screening experiments included anti-ganglioside antibody detection with ELISA, nodo/paranodal (NF155, NF140, NF186, CNTN1 and CNTN1/CASPR1 complex) antibody detection by ELISA and cell-based assays, immunocytochemistry using patient sera on murine dorsal root ganglia (DRG) neurons and

neuroblastoma-derived human motor neurons (IgG and IgM) and reactivity pattern assessment by immunohistochemistry on monkey sciatic nerve sections (IgG and IgM).

Testing for nodo/paranodal antibodies

Autoantibodies against NF140, NF186, NF155, CNTN1 and CASPR1 were tested by ELISA.

Maxisorb 96-well ELISA plates (Thermo Fisher Scientific, NUNC, Denmark) were coated with 1 µg/ml human recombinant CNTN1 protein (Sino Biological Inc., Georgia, USA), 1 µg/ml NF155 protein (Origene, Maryland, USA), 1 µg/ml NF140 protein (Sino Biological), 1 µg/ml NF186 protein (Origene) or 5 µg/ml CASPR1 protein (R&Dsystems, MI, USA) overnight at 4 °C. Wells were blocked with 5% non-fat milk in PBS 0.1% Tween 20 for 1 h, incubated with sera diluted 1/100 in blocking buffer for 1 h, and then incubated with peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG secondary antibody (Invitrogen, CA, USA) for 1 h at room temperature. ELISA was developed with tetramethylbenzidine solution (Biolegend, California, USA), and the reaction was stopped with 25% sulfuric acid. Optical density (OD) was measured at 450 nm in a Multiscan ELISA reader. Samples were considered positive by ELISA when they had a ΔOD higher than mean healthy control ΔOD plus two standard deviations.

Cell-based assays were used as previously described [25] as a second confirmatory technique for questionable cases. Briefly, mammalian expression vectors encoding human NF140, NF186, NF155, CNTN1 or CASPR1 were transfected into HEK293 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde and blocked. ICC experiments were performed using patient's sera and appropriate primary and secondary antibodies.

Testing for anti-ganglioside antibodies

Patients' sera were screened for the presence of anti-ganglioside antibodies using a previously validated ELISA protocol [26] as the general detection method, and thin layer chromatography [27] for confirmatory experiments. Anti-ganglioside antibodies were considered positive at a 1/1000 titre.

Rat dorsal root ganglia neurons immunocytochemistry

DRG were dissected from E16 rat embryos, dissociated and plated in glass coverslips coated with laminin (Invitrogen) and poly-D-lysine (Sigma, MO, USA). Cells were grown in neurobasal medium (Gibco BRL, NY, USA) supplemented with B27 (Gibco), Glutamax (Gibco) and nerve growth factor (NGF) (Invitrogen). After 24 h, cytosine arabinoside (ARA-C) (Sigma) and fluorouracil

(5-FU) (Sigma) were added to the medium to remove fibroblasts. Then, medium was replaced every other day until reaching complete growth and differentiation of DRG neurons.

Live DRG neurons were incubated for 1 h with patients' sera diluted 1/100 (for IgG experiments) or 1/40 (for IgM experiments) in culture medium at 37 °C. Cells were then fixed for 10 min with 4% PFA and incubated with secondary antibodies. Goat anti-human IgG or IgM AF488 (Molecular probes, Oregon, USA) were used as secondary antibodies at 1/1000 concentration.

Coverslips were mounted with Vectashield with DAPI and fluorescence signal intensity was scored in a 0–3 scale by two independent researchers. Images were obtained with an Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Human neuroblastoma-derived neurons immunocytochemistry

SH-SY5Y cells were plated in glass coverslips coated with laminin at 2.5 µg/ml (Invitrogen). Cells were grown in proliferation medium containing DMEM/F12 (1:1), fetal bovine serum (10%), L-glutamine (1%) and Sodium pyruvate (1%). After 24 h, proliferation medium was replaced by differentiation medium containing Neurobasal (Gibco) supplemented with B27 (Gibco), Glutamax (Gibco), nerve growth factor (Invitrogen) and retinoic acid at 10 µM (Sigma). Then, medium was replaced every other day until full differentiation was achieved. On days 5 or 6 of differentiation, cells were fixed for 15 min with paraformaldehyde 4%; and blocked with 5% normal goat serum in PBS; followed by incubation with patients' sera at 1/40 (for IgM) or 1/100 (for IgG). To observe the correct differentiation of the cells we also incubated them with chicken anti-panNeurofascin mAb (R&Dsystems) at 1/200. Goat anti-chicken IgG AF594 and goat anti-human IgG AF488 or goat anti-human IgM AF488 (Molecular Probes) were used as secondary antibodies at 1/1000 concentration.

Coverslips were mounted with Vectashield with DAPI and fluorescence signal intensity was scored in a 0–3 scale by two independent researchers. Images were obtained with an Olympus BX51 Fluorescence Microscope.

Peripheral nerve immunohistochemistry

Macaque peripheral nerve tissue slides (Inova Diagnostics, Inc., San Diego, CA) were blocked with 5% normal goat serum in PBS; followed by incubation with patients' sera at 1:10 (for IgM) or 1:20 (for IgG). Monkey-adsorbed goat anti-human IgG AF488 (Southern Biotech, Alabama, US) or goat anti-human IgM AF488 (Molecular Probes) were used as secondary antibodies at 1/500 concentration. Finally, slides were mounted with Fluoromount

medium (Sigma) and examined by two independent observers. Immunostaining patterns were analysed scoring fluorescence signal intensity of each nerve structure in a 0–3 scale. The nerve structures analysed were: nodes or paranodes, myelin from small myelinated fibres, myelin from large myelinated fibres, Schwann cells from unmyelinated fibres, large-fibre axons, and small-fibre axons. Reactivity against other non-nerve structures (fibroblasts, connective tissue, vessels) was not considered in the analysis.

To further study the staining patterns, peripheral nerve tissue slides were coated with mouse anti-human CD56 antibody (Becton Dickinson, New Jersey, USA) at 1:50 to stain non-myelinating Schwann cells (Remak bundles); or with rabbit anti-human S100 antibody (Abcam, Cambridge, UK) at 1:50 to stain myelinating Schwann cells. Goat anti-mouse IgG AF594 (for CD56), and goat anti-rabbit IgG AF594 (for S100) were used as secondary antibodies at 1/500 concentration.

Images were acquired using Leica TSC SP5 confocal microscope.

Statistical analysis

Results were analysed by GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software). Statistical comparison of proportions among groups was performed using contingency analysis with the application of Chi-square and a two-tailed Fisher's exact test, accepting an alpha-level <0.05 for statistical significance. To represent the results and perform hierarchical clustering of the results heatmap diagrams using the Clustvis web tool were performed [28].

To investigate the association between anti-ganglioside antibodies and prognosis a multivariable logistic regression analysis to predict the inability to walk at 6 months and at 1 year of follow-up ($GDS \geq 3$) was performed using the STATA software. A stepwise backward regression modelling to select variables independently associated with the outcome was performed first. The variables introduced in our initial multivariable models were selected based on known prognostic factors: age, initial GDS, diarrhoea, AMAN, serum NFL levels (analysed in a previous study with the same cohort) [29], serum anti-GM1 IgG antibodies and serum anti-GD1a IgG antibodies [29–32]. To perform the multivariable analysis patients with MFS were excluded, because our aim was to predict GBS prognosis and MFS is considered a different disease, including different pathophysiology, clinical presentation (it does not present with weakness), treatment (often untreated) and outcome (considered self-limiting and benign). Finally, the ability of the variable “presence of anti-GM1 IgG antibodies” to predict the inability to run at 1 year of follow-up ($GDS \geq 2$) was

evaluated in our previously reported multivariable logistic regression analysis [29].

Odds-ratios (OR) for the logistic regression analysis were reported with 95% confidence intervals and *p* values.

Results

Baseline characteristics

We included 100 participants from 11 Spanish centres participating in the IGOS study. GBS patients had an average of 57.4 years and were predominantly men (57%). 65% of patients presented with the sensorimotor variant, 19% presented with the pure motor GBS variant, 10% with MFS, 5% with the pure sensory variant and 1 patient with the ataxic variant. Regarding nerve conduction studies, 59% of patients were classified as AIDP, 12% as AMAN, 7% as AMSAN, 8% as normal, and 14% as equivocal. Detailed epidemiological features of the cohort were described elsewhere [29].

Screening for known autoantibodies

None of the GBS patients included in the study reacted against the paranodal and nodal proteins tested (NF155, NF140, NF186, CNTN1 and CASPR1).

Sixty-one patients tested positive for, at least, one anti-ganglioside antibody (GM1, GM2, GM3, GD1b, GD3, aGM1, GT1a, GT1b and GQ1b). Of these, 40 had IgG antibodies, 3 had IgM antibodies, and 18 had antibodies from both isotypes. Detailed anti-ganglioside reactivities are shown in Additional file 1.

Most frequent anti-ganglioside antibodies in our cohort were aGM1, GM1, GD1b and GQ1b. Overall, IgG anti-aGM1 antibodies were detected in 40% of patients; IgG and IgM anti-GM1 antibodies were detected in 27% and 15% of patients, respectively, IgG anti-GD1b antibodies in 30%, and IgG anti-GQ1b antibodies in 21% patients.

Antibodies targeting peripheral nerve neurons

ICC experiments with primary cultures of rat DRG neurons and human motor neurons derived from a neuroblastoma cell line were used to identify novel IgG and IgM reactivities against peripheral nerve neurons. The screening was performed in 100 serum samples from GBS patients and 90 serum samples from a control group (including healthy controls and patients with other neuromuscular diseases). ICC results were grouped in three separate categories: moderate-to-strong positives (including scores 2 and 3), all positives (including scores 1, 2 and 3), and negatives (score 0). Detailed results are shown in Additional file 2, Fig. 1 and Table 1.

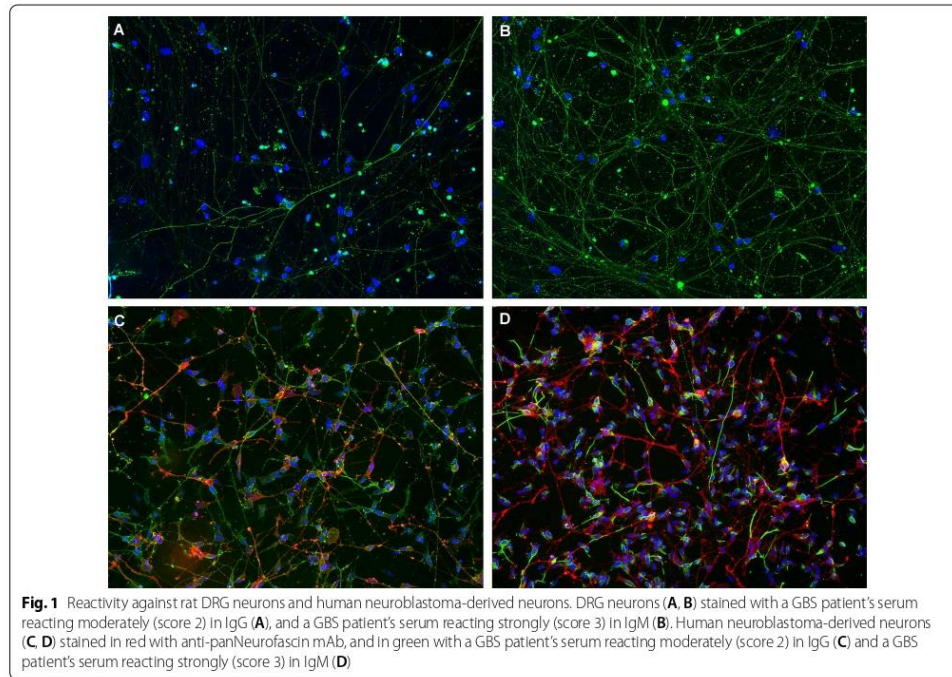


Table 1 Statistical analysis of DRG and neuroblastoma neurons ICC, and monkey peripheral nerve IHC

	GBS patients (n = 100)		Controls (n = 90/56)		p value	
	Any reactivity	Strong reactivity	Any reactivity	Strong reactivity	Any reactivity	Strong reactivity
Neuroblastoma neurons IgG	11 (11%)	2 (2%)	10/90 (11.1%)	0/90 (0.0%)	> 0.999 (ns)	0.499 (ns)
Neuroblastoma neurons IgM	28 (28%)	8 (8%)	11/90 (12.2%)	2/90 (2.2%)	0.011 (*)	0.105 (ns)
DRG neurons IgG	32 (32%)	6 (6%)	6/90 (6.7%)	0/90 (0.0%)	< 0.0001 (***)	0.030 (*)
DRG neurons IgM	34 (34%)	11 (11%)	22/90 (24.4%)	2/90 (2.2%)	0.156 (ns)	0.020 (*)
Monkey peripheral nerve IgG	56 (56%)	17 (17%)	30/56 (53.6%)	3/56 (5.4%)	0.8669 (ns)	0.0455 (*)
Monkey peripheral nerve IgM	44 (44%)	10 (10%)	20/56 (35.7%)	6/56 (10.7%)	0.3964 (ns)	> 0.999 (ns)

Comparison between GBS patients and controls. *Strong reactivity* includes scores 2 and 3, and *any reactivity* includes scores 1, 2 and 3. Fluorescence intensity scores were analysed using contingency analysis with the application of a Fisher's exact test, accepting an alpha-level of < 0.05 to determine significance

Overall, 22 (22%) GBS patients reacted moderately or strongly against DRG or neuroblastoma neurons, whereas 4 (4.4%) controls reacted only moderately. These differences were statistically significant ($p = 0.0005$).

Antibodies against DRG neurons appeared significantly more frequently in GBS patients than in controls (32% vs 6.7%, $p < 0.0001$) taking all positive tests in account; the same happened if only moderate and strong positives

were considered, both in IgG (6% vs 0%, $p = 0.03$) and IgM experiments (11% vs 2.2%, $p = 0.02$).

In neuroblastoma-derived neuron ICC experiments 28 (28%) samples from the GBS group showed IgM autoantibodies; of these 8 (8%) showed moderate or strong reactivity. These proportions were significantly higher than in the control group (12.2% and 2.2%, respectively; $p = 0.011$). Differences in autoantibody proportions between GBS patients and controls were not observed

in neuroblastoma-derived neuron experiments when assessing IgG antibodies.

Antibodies targeting peripheral nerve tissue

We analysed the full GBS cohort and 56 controls.

We analysed the staining intensity of six different structures within the nerve, including nodes or paranodes, myelin from small myelinated fibres, myelin from large myelinated fibres, Schwann cells from unmyelinated fibres, large-fibre axons, and small-fibre axons. Staining patterns can be found in Additional file 3.

IgG and IgM reactivity against nerve tissue was frequently detected in GBS patients and controls. Overall, about 70% of GBS patients and controls sera bound to nerve structures. IgG and IgM from GBS patients reacted moderately in 17 (17%) and strongly in 10 (10%) against monkey nerve structures. In the control group IgG and IgM reacted moderately in 8 (14.3%) and strongly in 1 (1.8%) against monkey nerve structures. The difference between the amount of GBS patients and controls reacting moderately or strongly against monkey peripheral nerve was statistically significant ($p=0.0455$) only for IgG autoantibodies (Table 1).

Differences in IHC patterns of reactivity from GBS patients and controls were not statistically significant for any of the structures analysed (Additional file 4). Nonetheless, some specific reactivity patterns were only detected in GBS patients and not in controls (Fig. 2). Eight (8%) GBS patients' IgG reacted strongly against myelin, whereas only 2 controls showed weak reactivity against this structure. Moreover, we observed that 13

(13%) GBS patients' IgG had a strong reactivity against Schwann cells (myelinating and non-myelinating) while only one of the controls (1.8%) showed strong reactivity against Schwann cells (this difference is statistically significant; $p=0.0192$).

Combined autoantibody screening analysis

We also analysed if GBS patients with or without anti-ganglioside antibodies differed in the reactivity patterns in the peripheral nerve cell and tissue autoantibody screening experiments. No differences were found between those two groups (Additional file 4), suggesting that the heterogeneity of the autoantibody repertoire appears even when a specific antigen is found.

We used a heatmap graph to represent all the autoantibody screening results performed in our GBS cohort (Fig. 3) [28]. This graph provides visual representation of the heterogeneity of the autoantibody repertoire in GBS sera.

Clinical correlations

Among patients with Miller Fisher syndrome, 8/10 (80%) had IgG anti-GQ1b antibodies, whereas in the rest of GBS patients only 14.4% (13/90) had these antibodies, usually in combination with other reactivities. IgG anti-GM1 antibodies were more frequently detected in patients with the pure motor variant than in those with other clinical variants [13/19 (68.4%) vs 14/81 (17.3%)] and in patients classified electrophysiologically as AMAN than in the rest of GBS patients (83.3% vs 19.3%). All these differences were statistically significant ($p < 0.0001$).

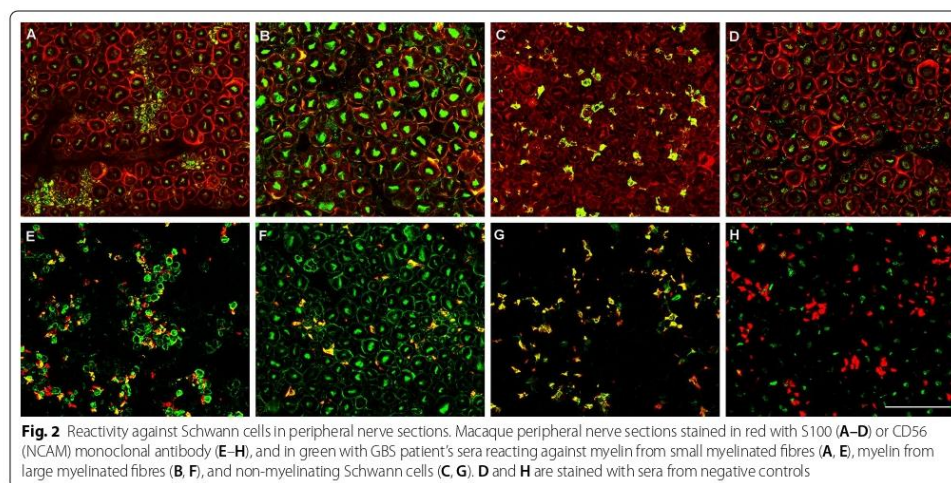
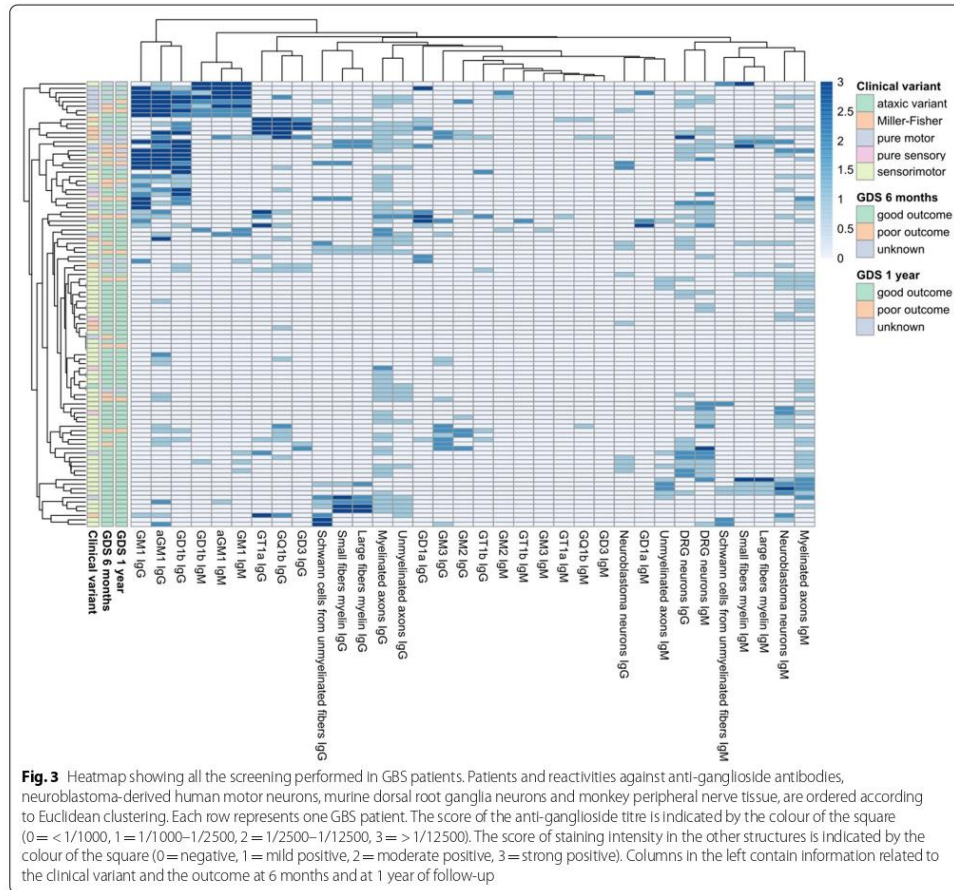


Fig. 2 Reactivity against Schwann cells in peripheral nerve sections. Macaque peripheral nerve sections stained in red with S100 (A–D) or CD56 (NCAM) monoclonal antibody (E–H), and in green with GBS patient's sera reacting against myelin from small myelinated fibres (A, E), myelin from large myelinated fibres (B, F), and non-myelinating Schwann cells (C, G). D and H are stained with sera from negative controls



When we analysed the general clinical characteristics of the subgroup of patients with strong IgG reactivity against Schwann cells ($n=13$), we did not observe any specific pattern that could distinguish them from the rest of the cohort. Ten (76.9%) of these patients presented with the sensorimotor clinical variant, whereas in the general cohort 65% presented this variant; and the proportions of nerve conduction studies subgroups were similar to those found in the general cohort (53.8% vs 59% of AIDP electrophysiological variant). Regarding the outcome, the percentage of patients having a good

outcome at 6 months and 1 year are similar in the two groups (about 75%).

In the subgroup of patients with IgG or IgM reactivity against DRG neurons ($n=14$), we did not find clinical differences with the whole GBS cohort. Briefly, 71.4% of patients staining strongly DRG neurons were classified as AIDP, and 64.3% presented with the sensorimotor clinical variant.

We did not detect any difference in peripheral nerve cell and tissue reactivity patterns or frequencies between the samples collected before starting the treatment (62%) and those collected after the treatment (38%). We neither observed any correlation of

any of the reactivity patterns with other clinical characteristics as pain, ataxia, or the presence of antecedent infection.

Prognostic value of anti-ganglioside antibodies

First, we conducted a univariate analysis to select variables that were associated with the outcome. Patients with serum IgG anti-GM1 antibodies presented poorer outcomes than patients without the antibodies at 6 months [38.1% vs 16.1% ($p=0.04$)], and 1 year [35.3% vs 9.7% ($p=0.014$)]. Anti-GD1a IgG antibodies were not associated with prognosis (Table 2). For the multivariate analysis, we included GM1 IgG, serum NFL levels, diarrhoea, age, and initial GDS.

We observed that having anti-GM1 IgG antibodies at baseline was independently associated with the inability to walk at 1 year of follow-up, after a backward stepwise selection modelling (OR 6.98, 95% CI 1.6–30.36; $p=0.01$). However, the presence of anti-GM1 IgG antibodies was not independently associated with having a poor outcome at 6 months (Table 2).

To analyse if anti-GM1 titres were associated with the GBS disability score, we performed a linear regression. We did not observe a positive correlation between antibody titres and disability at 6 months and at 1 year.

Finally, when we included the presence of anti-GM1 antibodies in our previously reported prognostic study [29], we observed that having anti-GM1 IgG antibodies at baseline was associated with the inability to run at 1 year, but this association was not independent from the other known prognostic factors and sNFL, age and AMAN remained in the model as independent factors associated with residual disability at 1 year.

Discussion

Our work describes a comprehensive autoantibody screening that provides experimental evidence of the heterogeneity of the autoantibody repertoire in patients fulfilling GBS diagnostic criteria.

Our study shows that GBS patients have a heterogeneous repertoire of autoantibodies targeting nerve cells and structures. Except for patients with anti-ganglioside antibodies and a minor subset of patients with antibodies targeting Schwann cells and the myelin sheath, this repertoire varies in frequency and intensity of staining, but it is not qualitatively different from controls. Antibodies targeting peripheral nerve cells of both IgG and IgM isotypes are significantly more frequent in patients than in controls, but no clear differences are seen when antibodies are tested using immunohistochemistry on monkey nerve preparations. Considering that whole nerve monkey preparations likely display protein antigens in a conformation that is phylogenetically closer to that of human

nerves, this may imply that autoantibodies targeting nerve structures are present in normal human repertoire at lower titers, that they arise as a natural epiphenomenon of a T-cell mediated damage and are not pathogenic, or that other autoantibodies, targeting different types of molecules (such as lipids or glycans), for which our techniques are not optimized, are yet to be discovered.

Whether these autoantibodies arise from a process of molecular mimicry, or from an unspecific and polyclonal activation of pre-existing B cells, remains unclear. The general absence of common patterns suggests the latter, but the well-established molecular mimicry process described in anti-ganglioside-associated GBS supports the former. In anti-GM1-associated GBS the sequence of pathogenic events includes an immune response to an infection leading to the appearance of antibodies cross-reacting with peripheral nerve and nerve root gangliosides and triggering post-infectious inflammation [33]. Interestingly, in this screening we did not find clear differences in the reactivity patterns between GBS patients with or without anti-ganglioside antibodies, but we observed in both groups a higher amount of patients staining nerve structures than in controls. These findings suggest that the immune response in GBS is not restricted to the production of anti-ganglioside antibodies, but it is also targeting other peripheral nerve structures. This observation may either reflect the presence of a polyclonal, not antigen-driven, reactivation of a pre-existing repertoire that, in some patients, includes gangliosides, or the concomitant activation (by epitope spreading or bystander activation) of unspecific B cells in addition to the ganglioside-driven antigen-specific response.

Previous studies in other inflammatory neuropathies such as chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP), showed that frequencies of reactivity against DRG neurons in CIDP patients did not differ from healthy controls [34], in contrast with our results (shown in Table 2). GBS and CIDP are similar diseases both clinically and electrophysiologically, so this difference supports the idea that a heterogeneous autoantibody response against multiple nerve antigens arises in GBS while this does not happen in chronic inflammatory and demyelinating neuropathies in which a specific, antigen-driven autoantibody response arises, as the recent discovery of the nodo-paranodal antibodies supports [35]. Differences in severity of these two diseases may also account for this observation.

We observed that 13% of GBS patients showed strong IgG reactivity against Schwann cells of monkey peripheral nerve. This observation is in agreement with previous findings: Kwa et al. observed that 24% of GBS patients had IgG antibodies against

Table 2 Association between baseline anti-GM1 and anti-GD1a antibodies and prognostic Univariate and Multivariable logistic analysis for inability to walk independently at 6 months

Variable	OR	95% CI	P
<i>Univariate analysis</i>			
GM1 IgG	3.2	1.05–9.71	0.04
GD1a IgG	0.48	0.05–4.24	0.515
logNFL	3.22	1.46–7.14	0.004
AMAN	2.97	0.73–12.07	0.127
Diarrhoea	3.64	1.21–10.91	0.021
Age	1.05	1.01–1.10	0.005
Initial GDS	3.15	1.38–7.18	0.006
<i>Multivariable logistic analysis</i>			
logNFL	3.13	1.27–7.67	0.012
Age	1.05	1.01–1.10	0.013
Univariate and Multivariable logistic analysis for inability to walk independently at 1 year			
Variable	OR	95% CI	P
<i>Univariate analysis</i>			
GM1 IgG	5.09	1.38–18.73	0.014
GD1a IgG	0.92	0.10–8.44	0.944
logNFL	3.11	1.27–7.55	0.012
AMAN	1.475	0.27–7.97	0.652
Diarrhoea	2.7	0.74–9.82	0.131
Age	1.06	1.01–1.11	0.014
Initial GDS	2.79	1.12–6.93	0.027
<i>Multivariable logistic analysis</i>			
GM1 IgG	6.98	1.60–30.36	0.01
Age	1.07	1.01–1.12	0.01
Univariate and Multivariable logistic analysis for inability to run independently at 1 year			
Variable	OR	95% CI	P
<i>Univariate analysis</i>			
GM1 IgG	4.16	1.39–12.49	0.011
GD1a IgG	0.72	0.13–3.99	0.710
logNFL	4.37	1.95–9.78	<0.0001
AMAN	6.53	1.57–27.17	0.01
Diarrhoea	2.33	0.83–6.57	0.109

Table 2 (continued)

Univariate and Multivariable logistic analysis for inability to run independently at 1 year

Variable	OR	95% CI	P
Age	1.04	1.01–1.07	0.023
Initial GDS	1.81	1.08–3.04	0.025
<i>Multivariable logistic analysis</i>			
Age	1.04	1.01–1.08	0.022
AMAN	6.19	1.01–38.02	0.049
logNfL	3.17	1.34–7.50	0.009

logNfL log-transformed neurofilament light chain; *AMAN* acute motor axonal neuropathy; *GDS* Guillain-Barré Syndrome Disability Score

non-myelinating human Schwann cells [36], and Valat et al. also detected that a significant percentage of CIDP and GBS patients (about 25%) presented with IgG or IgM reactivity against myelin and that the staining patterns on Schwann cells were diverse, suggesting that diverse myelin antigens are being recognized by the autoantibodies [37].

Our study also confirms, in a well-characterized GBS cohort, that gangliosides are the most frequent specific antigens in GBS patients and that they associate to specific disease variants. The value of testing anti-ganglioside antibodies in the GBS routine clinical care is controversial, but it is clear that some antibodies are associated with specific clinical phenotypes [38]. IgG anti-GQ1b antibody is a diagnostic marker and a pathogenic antibody in MFS, and is often cross-reactive with GT1a [9]. Moreover, IgG anti-GM1 antibodies associate with the pure motor (clinical) and AMAN (electrophysiological) variants. Our results, with 80% of MFS patients having anti-GQ1b antibodies and 68.4% of pure motor patients having anti-GM1 antibodies at baseline, confirm these associations. However, our study lacks power to find other potential associations previously described (anti-GD1b with acute ataxic neuropathy, anti-GT1a and pharyngo-cervico-brachial variant) [39, 40] that will need to be confirmed in even larger cohorts. Likewise, the clinical relevance of antibodies targeting other structures (neurons, peripheral nerve tissue...) is unclear, since their association with GBS is not completely specific or the number of patients with each particular reactivity is too low to draw any conclusions.

Some studies have reported a correlation between IgG anti-GM1 and anti-GD1a antibodies with a poor outcome in GBS patients [13, 14, 33, 41]. In our cohort, IgG anti-GD1a antibodies did not associate to a poor outcome of the disease [13]. However, our data confirm that IgG anti-GM1 antibody is an independent prognostic factor that associates with poor prognosis at 1 year, supporting that it may be a marker for long-term axonal damage. Whether the presence of complement-fixing anti-GM1 antibodies is the driver of this long-term disability, an important therapeutic question (that would enable the use of complement inhibitors in these patients), remains to be elucidated.

Although in this study we analysed the prognostic value of anti-ganglioside antibodies using the traditional outcome measures: inability to walk ($GDS \geq 3$) at 6 months and at 1 year, we have recently used the inability to run ($GDS \geq 2$) as a measure of the presence of long-term residual disability. In this recent study we showed that high baseline sNfL were independently associated with inability to run at 1 year [29]. In agreement with these findings, we observed that including in the model

the variable “presence of serum IgG anti-GM1 antibodies”, sNfL levels remained as an independent prognostic factor, whereas anti-GM1 antibodies did not. These results confirm that sNfL levels are a prognostic factor that informs better on axon status and, consequently, on long-lasting disability.

It is interesting to note that we did not find any patient with anti-nodal/paranodal antibodies (CNTN1, NF140, NF186, NF155 and CASPR1) in our GBS cohort. Although previous studies from other authors have found some GBS positive patients in their cohorts [14–18], and case-reports and series describe the association of anti-nodal/paranodal antibodies with aggressive inflammatory neuropathies frequently misdiagnosed as GBS, these antibodies are rare and we cannot rule out the possibility that they are present in other selected patients that our cohort failed to capture.

One of the limitations of our study is the number of patients and controls included. We have small groups of patients with similar staining patterns in which it is difficult to establish clear clinical-immunological correlations. Nevertheless, this is the first large prospective study assessing the autoantibody repertoire against peripheral nerve structures in GBS patients and antigen-identification experiments will follow in those patients showing specific staining patterns that are absent in controls.

The existence of clear subgroups associated with anti-ganglioside antibodies, in contrast with the diversity in the new reactivities analysed, suggests that this apparent heterogeneity may be also due to technical caveats, because our study protocol is optimized for proteins and not for lipids or glycans. Moreover, other, not properly controlled factors, could have influenced heterogeneity in staining patterns (treatment, comorbidities...), and will need to be assessed in larger cohorts.

Conclusions

In conclusion, our study highlights the heterogeneity of the profile of autoantibodies targeting peripheral nerve structures, confirms gangliosides as the most frequent target antigens in the GBS autoantibody repertoire and their prognostic value in long-term GBS prognosis, and identifies small subsets of GBS patients with specific staining patterns in which further antigen-identification experiments could demonstrate novel and clinically relevant autoantibody reactivities in the future.

Abbreviations

GBS: Guillain-Barré syndrome; IGOS: International GBS Outcome Study; DRG: Dorsal-root ganglia; MFS: Miller Fisher syndrome; AIDP: Acute inflammatory demyelinating polyneuropathy; AMAN: Acute motor axonal neuropathy;

AMSAN: Acute motor-sensory axonal neuropathy; GDS: GBS disability score; ALS: Amyotrophic lateral sclerosis; CMT: Charcot-Marie-Tooth; NF155: Neurofascin-155; NF140: Neurofascin-140; NF186: Neurofascin-186; CNTN1: Contactin-1; CASPR1: Contactin-associated protein 1; PFA: Paraformaldehyde; NFL: Neurofilament light chain; OR: Odds-ratio; CIDP: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02301-0>.

Additional file 1: Figure 1. Heatmap showing anti-ganglioside antibodies in the GBS cohort. Patients and reactivities against anti-ganglioside antibodies are ordered according to Euclidean clustering. Each row represents one GBS patient. The score of the anti-ganglioside titre is indicated by the colour of the square (0 = <1/1000, 1 = 1/1000–1/2500, 2 = 1/2500–1/12500, 3 = >1/12500). Columns in the left contain information related to the clinical variant and the outcome at 6 months and at 1 year of follow-up.

Additional file 2: Figure 2. Staining patterns analyzed in ICC over rat DRG neurons and human neuroblastoma-derived neurons. DRG neurons (A–H) or neuroblastoma neurons (I–P) were stained with control or patient's sera in green. Signal intensity of IgG (A–D, I–L) or IgM (E–H, M–P) reactivity was scored in a 0–3 scale (0 = negative, 1 = mild positive, 2 = moderate positive, 3 = strong positive). Neuroblastoma neurons were counter-stained in red with anti-panNeurofascin mAb.

Additional file 3: Figure 3. Staining patterns analyzed in IHC over monkey peripheral nerve. Macaque peripheral nerve transverse sections stained with CNTN1+ positive CIDP patient's serum reacting against paranodes (A), small fiber axons (B), non-myelinating Schwann cells (C), myelin from small myelinated fibers (D), large fiber axons (E), and myelin from large myelinated fibers (F).

Additional file 4: Table 1. Statistical analysis of structures observed in IHC over monkey peripheral nerve. **Table 2.** Statistical comparison between GBS patients with and without anti-ganglioside antibodies.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Department of Medicine at the Universitat Autònoma de Barcelona and the IGOS consortium for their support. We also would like to thank all our patients for their patience and collaboration, and the animals that were killed to perform this study.

Author's contributions

CL acquired the data, performed the experiments, analysed the data and drafted the manuscript; TF performed anti-ganglioside antibodies experiments; LMA, EPG, JDM, RRG, ECV, JT, CC, CH, GGG, MCJM, JB, MUST, TGS, JPF, CMI, IRM, IJP, EMH, GMT and CDG acquired samples and data and revised the manuscript for intellectual content; MC, NL, EG, XSC, LMM, CJ and II revised the manuscript for intellectual content; LQ designed and conceptualized the study; interpreted the data and revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work is supported by *Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)*, *Instituto de Salud Carlos III*, Spain and FEDER under Grant FIS19/01407 and INT20/00080; by the GBS-CIDP Foundation International; and by the Gofundme campaign number 86547262 organized by Adela Gómez. LMA was supported by a personal Rio Hortega grant CM19/00042. XSC was supported by a "Sara Borrell" post-doctoral fellowship project "CD18/00195", funded by Instituto de Salud Carlos III and co-funded by European Union (ERDF/ESF, "A way to make Europe"/"Investing in your future"), RR-G, NDL, EC-V, JT-S, EG, II and LQ are members of the ERN Euro-NMD.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and the local institutional review boards of participating hospitals or universities. All patients gave written informed consent to participate in the study. Animal procedures were performed according to a protocol approved by our Institution's Animal Ethics Committee.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Immunology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ³Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain. ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED, Madrid, Spain. ⁵Neuromuscular Unit, Department of Neurology, Bellvitge University Hospital, Barcelona, Spain. ⁶Neurometabolic Diseases Group, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain. ⁷Department of Neurology, Hospital Universitario Infanta Sofía, Madrid, Spain. ⁸Department of Neurology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (IDIVAL), University of Cantabria, Santander, Spain. ⁹Department of Neurology, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago, Spain. ¹⁰Department of Neurology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain. ¹¹Department of Neurology, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain. ¹²Department of Neurology, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Spain. ¹³Department of Neurology, Hospital Clínico de Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁴Department of Neurology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain. ¹⁵Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Research Institute imas12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

Received: 14 July 2021 Accepted: 18 October 2021

Published online: 01 November 2021

References

- Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*. 1990;27:521–4.
- Feasby TE, et al. An acute axonal form of Guillain-Barré polyneuropathy. *Brain*. 1986;109:1115–26.
- Wakerley BR, Uncini A, Yuki N. Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes—new diagnostic classification. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:537–44.
- Shahrizaila N, Lehmann HC, Kuwabara S. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* (London, England). 2021;397:6736.
- Van Den Berg B, et al. Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:469–82.
- Martín-Aguilar L, Pascual-Goni E, Querol L. Autoantibodies in immune-mediated inflammatory neuropathies. *Med Clin (English Ed)*. 2019;153:360–7.
- Restrepo-Jiménez P, et al. The immunotherapy of Guillain-Barré syndrome. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18:619–31.
- Green DM. Advances in the management of Guillain-Barré syndrome. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2002;2:541–8.
- Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: mini-review. *J Neuroimmunol*. 2010;223:5–12.
- Emilien D, Hugh W. Diagnostic utility of auto antibodies in inflammatory nerve disorders. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2:107–12.
- Kuwabara S, et al. IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*. 1998;44:202–8.

12. Willison HJ, Veitch J, Paterson G, Kennedy PGE. Miller Fisher syndrome is associated with serum antibodies to GQ1b ganglioside. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56:204–6.
13. Yamagishi Y, et al. Serum IgG anti-GD1a antibody and mEGOS predict outcome in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323960>.
14. Rajabally YA, Uncini A. Outcome and its predictors in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83:711–8.
15. Devaux JJ, Odaka M, Yuki N. Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barré syndrome. *J Peripher Nerv Syst*. 2012;17:62–71.
16. Prüss H, Schwab JM, Derst C, Görtzen A, Veh RW. Neurofascin as target of autoantibodies in Guillain-Barré syndrome. *Brain*. 2011;134:1–2.
17. Stengel H, et al. Anti-pan-neurofascin IgG3 as a marker of fulminant autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2019;6:1–11.
18. Doppler K, et al. Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain*. 2016;139:2617–30.
19. Appeltshauer L. Anti-paranodal antibodies and IgG subclasses in acute autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000817>.
20. Schafflick D, Kieseier BC, Wiendl H, Meyer zu Horste G. Novel pathomechanisms in inflammatory neuropathies. *J Neuroinflamm*. 2017;14:1–17.
21. Jacobs BC, et al. International Guillain-Barré Syndrome Outcome Study: protocol of a prospective observational cohort study on clinical and biological predictors of disease course and outcome in Guillain-Barré syndrome. *J Peripher Nerv Syst*. 2017;22:68–76.
22. Doets AY, et al. Regional variation of Guillain-Barré syndrome. *Brain*. 2018;141:2866–77.
23. Sejvar JJ, et al. Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*. 2011;29:599–612.
24. Hughes RAC, Newsom-Davis J, Perkin G, Pierce J. Controlled trial of prednisolone in acute polyneuropathy. *Lancet* (London, England). 1978;312:750–3.
25. Siles AM, et al. Antibodies against cell adhesion molecules and neural structures in paraneoplastic neuropathies. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018;5:559–69.
26. Willison HJ, et al. Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Eur J Neurol*. 1999;6:71–7.
27. Ohanlon GM, et al. Peripheral neuropathy associated with anti-GM2 ganglioside antibodies: clinical and immunopathological studies. *Autoimmunity*. 2000;32:133–44.
28. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:W566–70.
29. Martín-Aguilar L, et al. Serum neurofilament light chain predicts long-term prognosis in Guillain-Barré syndrome patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323899>.
30. Hiraga A, et al. Recovery patterns and long term prognosis for axonal Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:719–22.
31. Kuwabara S, Mori M, Ogawara K, Hattori T, Yuki N. Indicators of rapid clinical recovery in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;70:560–2.
32. Hadden RDM, et al. Preceding infections, immune factors, and outcome in Guillain-Barré syndrome. *Neurology*. 2001;56:758–65.
33. Van Koningsveld R, et al. Infections and course of disease in mild forms of Guillain-Barré syndrome. *Neurology*. 2002;58:610–4.
34. Querol L, et al. Antibodies against peripheral nerve antigens in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Sci Rep*. 2017;7:1–9.
35. Querol L, Devaux J, Rojas-García R, Illa I. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Neurol*. 2017;13:533–47.
36. Kwa MSG, et al. Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies. *Brain*. 2003;126:361–75.
37. Vallat JM, et al. Antibody- and macrophage-mediated segmental demyelination in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: clinical, electrophysiological, immunological and pathological correlates. *Eur J Neurol*. 2020;27:692–701.
38. Leonhard SE, et al. Diagnosis and management of Guillain-Barré syndrome in ten steps. *Nat Rev Neurol*. 2019;15:671–83.
39. Pan CL, Yuki N, Koga M, Chiang MC, Hsieh ST. Acute sensory ataxic neuropathy associated with monospecific anti-GD1B IgG antibody. *Neurology*. 2001;57:1316–8.
40. Koga M, Yuki N, Ariga T, Morimatsu M, Hirata K. Is IgG anti-GT1a antibody associated with pharyngeal-cervical-brachial weakness or oropharyngeal palsy in Guillain-Barré syndrome? *J Neuroimmunol*. 1998;86:74–9.
41. Kuwabara S, et al. Intravenous immunoglobulin therapy for Guillain-Barré syndrome with IgG anti-GM1 antibody. *Muscle Nerve*. 2001;24:54–8.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year.

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



