



Anticossos contra antígens de membrana neuronal en encefalitis paraneoplàsica i idiopàtica

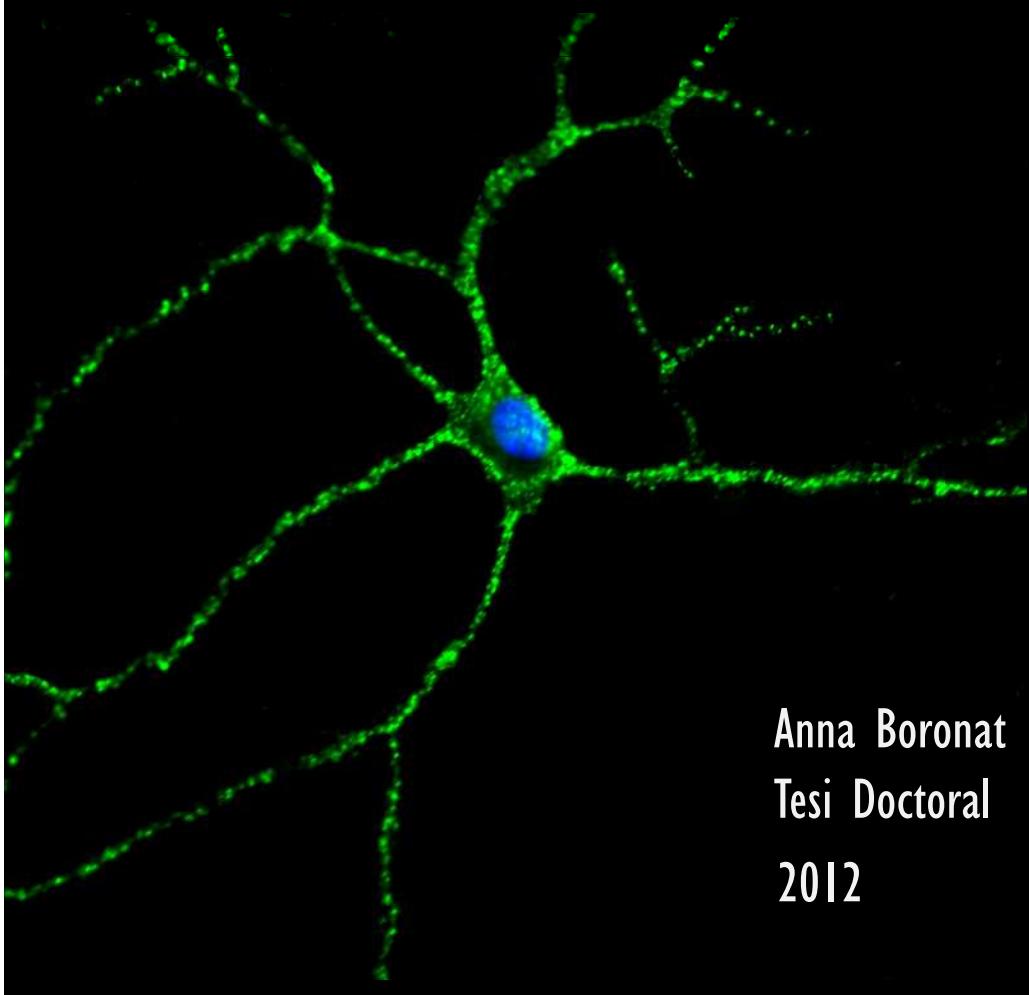
Anna Boronat Barado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (deposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoriza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoriza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (deposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (deposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ANTICOSOS CONTRA ANTÍGENS DE MEMBRANA NEURONAL EN ENCEFALITIS PARANEOPLÀSICA I IDIOPÀTICA



Anna Boronat Barado
Tesi Doctoral
2012

Unitat de Neuroimmunologia. Fundació Hospital Clínic/IDIBAPS

Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Barcelona 2012

Anticossos contra antígens de membrana neuronal en encefalitis paraneoplàsica i idiopàtica

Tesi doctoral realitzada per:

Anna Boronat Barado

Per optar al grau de:

Doctora per la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat de Biomedicina

Directors de Tesi:

Dr. Francesc Graus Ribas

Dra. Lídia Sabater Baudet

Informe per a la presentació en format de compendi de publicacions de la tesi doctoral titulada: “Anticossos contra antígens de membrana neuronal en encefalitis paraneoplàsica i idiopàtica” i defensada per la doctoranda Anna Boronat i Barado

Les publicacions presentades per l'obtenció del grau de doctor per la Universitat de Barcelona, Programa de Doctorat de Biomedicina indicant factor d'impacte i participació de la doctoranda són les següents:

Publicacions:

I. Títol: Encephalitis and antibodies to DPPX, a subunit of Kv4.2 potassium channels.

Autors: Boronat.A, Jeffrey.M, Gresa.N, Jeong.Hyo-Young, Walsh.Michael, Roberts.J.Kirk, Martinez-Hernandez.E, Rosenfeld.M, Balice-Gordon. M, Graus.F, Bernardo.R, Dalmau.J.

Revista: Annals of Neurology 2012. Accepted Article doi: 10.1002/ana.23756 13 SEP 2012

Factor d'impacte: 11.089 (dades any 2011)

Participació del doctorand: Aquest article detalla les característiques clíniques e immunològiques de 4 pacients amb símptomes psiquiàtrics, en 3 dels casos precedides per una diarrea intensa. S'identifica la molècula de superfície *dipeptidyl-peptidase-like protein-6* (DPP6 o DPPX), una subunitat auxiliar del canal de potassi Kv4.2 com a nou antigen i diana dels anticossos d'aquests pacients. DPPX s'expressa abundantment en l' hipocamp i cerebel. En aquest treball es demostra que la molècula també s'expressa en les neurones del plexe mientèric de l'intestí i que els anticossos dels pacients reaccionen amb les neurones del cervell i de l'intestí donant lloc a la síndrome.

La doctoranda en aquest cas ha desenvolupat personalment el treball tècnic gairebé en la seva totalitat a excepció dels animals deficientes en la proteïna. Va ser qui va identificar la molècula que dona cós al desenvolupament de l'estudi. Ha descrit el perfil immunològic de la malaltia demostrant la cross-reacció dels anticossos en les neurones del cervell i el intestí. També ha contribuït al disseny experimental del procés.

Aquest treball acaba de ser publicat i no es preveu que s'utilitzi per cap més tesi.

2. Títol: Analysis of antibodies to surface epitops of contactin-2 in multiple sclerosis.

Autors: Boronat A, Sepúlveda M, Llufrí S, Sabater L, Blanco Y, Gabilondo I, Solà N, Viloslada P, Dalmau J, Graus F, Saiz, A.

Revista: J.Neuroimmunology 2012; 244(1-2):103-6

Factor d'impacte 2.959

Participació del doctorand: La contactina-2 ha estat identificada com a un autoantigen reconegut tant per cèl·lules T com pels anticossos en alguns malalts amb esclerosis múltiple. Aquesta proteïna està expressada en oligodendròcits, cèl·lules de Schwann i en la regió juxtaparanodal de les fibres mielinitzades, i també s'expressa en les neurones de la substància gris de l' hipocamp i medul·la espinal. La localització suggereix que els anticossos contra contactina-2 podrien estar implicats en les lesions de la substància gris en malalts amb EM. En aquest estudi s'ha analitzat la freqüència dels autoanticossos contra contactina-2 amb un sistema de transfecció cel·lular en el sèrum de 105 pacients de EM amb almenys 5 anys de seguiment. (19 amb la síndrome aïllada, 51 en fase remitent-recurrent, 20 secundàriament progressiva, i 15 primàriament progressiva). Anticossos contra contactin-2 es van detectar en 4 pacients en fase remitent-recurrent (7.8%). No es van observar característiques diferents en aquests pacients en quant a ressonància magnètica respecte als negatius per aquest anticòs. Aquest anticòs no és freqüentment associat a la EM.

En concret, la doctoranda ha participat en tots els experiments descrits en aquesta publicació. Ha portat a terme personalment tots els experiments descrits en aquest estudi.

Aquest treball no s'ha utilitzat en cap altre tesi doctoral.

3. Títol: GABA_B receptor antibodies in limbic encephalitis and anti-GAD-associated neurologic disorders.

Authors: Boronat A, Sabater L, Saiz A, Dalmau J, Graus F.

Revista: Neurology. 2011. 1;76(9):795-800

Factor d'impacte: 8.312

Participació del doctorand: D'aquest estudi podem concloure que els anticossos anti-receptor GABA_B són els anticossos més freqüents en els pacients amb un perfil d'encefalitis límbica associada a càncer de pulmó de cèl·lula petita, prèviament considerats "seronegatius". Per contra, en pacients amb anticossos anti-GAD, la freqüència de trobar també anticossos anti-receptor de GABA_B és baixa, i només observada en un context paraneoplàsic.

La participació de la doctoranda en aquest estudi ha sigut la de fer la majoria dels experiments per determinar la freqüència dels anticossos anti-GABA_B.

Aquest treball no s'ha utilitzat per cap altra tesi doctoral i tots els co-autors disposen del grau de doctor.

4. Títol: The expanding clinical profile of anti-AMPA receptor encephalitis.

Authors: Graus F, Boronat A, Xifró X, Boix M, Svilgelj V, García A, Palomino A, Sabater L, Alberch J, Saiz A.

Revista: Neurology 2010; 74(10):857-9

Factor d'impacte 8.017

Participació del doctorand:

Recentment s'ha descrit la presència d'anticossos anti-receptor d'AMPA en un estudi amb malalts d'encefalitis límbica. Amb l'objectiu de descriure el perfil clínic d'aquests

malalts, vam estudiar el cas de 30 pacients: 17 d'ells tenien EL típica (dels quals 4 amb anticossos anti-VGKC, 4 anti-GAD, 2 anti-AMPA, 1 anti-AK5, 1 anti-Hu, i 5 eren negatius), i 13 no complien estrictament el criteri d'EL però presentaven amb

comportaments anormals que recordaven una psicosis aguda (11 dels quals tenien anticossos anti-R-NMDA i 2 anti-R-AMPA). Com a conclusió la detecció d'anticossos anti-receptor AMPA s'hauria de considerar en pacients, particularment dones, de més de 50 anys, que presenten EL o ràpids i progressius canvis de comportament anormals que recorden a una psicosis aguda.

Les proves convencionals d'estudis d'imaxe i líquid cefalorraquídi no són indicatius de la malaltia, i els anticossos es poden detectar per immunohistoquímica sobre teixit de rata post-fixat o teixit perfós amb paraformaldehid (mètode habitual per la detecció

dels anticossos onconeuronals), i es detecten preferentment en el líquid. Els resultats suggereixen que la causa és immunomediada, i els pacients responen al tractament amb immunsupressors.

La participació de la doctoranda en aquest estudi ha estat realitzar gran part del treball tècnic tant cel·lular com a nivell de teixit.

Aquest treball no s'ha utilitzat per cap altre tesi doctorals.

Directors de Tesi:

I.Dr. Francesc Graus Ribas

2. Dra. Lídia Sabater Baudet

Als meus pares

Un dia qualsevol

... Són les 7:40 am, buff! Sona el despertador, hora de llevar-se... obro un ull mentre em menojo les torrades i l'altre ull mentre em prenc el cafè davant les notícies del matí. Bon dia compi! la Consol ja es lleva, i la Marta també? Quina hora és??? Ja em puc donar pressa, cap a la dutxa, mentre vaig pensant què he de fer en el dia d'avui, anglès? shiatsu? swing? A no! Que ja és divendres! I avui tinc un dia intens de vida social!! Però abans cap a la feina, avui tindrem els resultats de la immunoprecipitació! Quins nervis! Haurà sortit bé? El marcador es veia bé, i aquella banda dèbil que s'intuïa... podria ser alguna cosa, no?... espero que hagi sortit bé, perquè sinó... quasi no queda mostra per repetir-ho i continuar fent experiments... bé, sigui com sigui avui ho sabrem! Uoh! Ens veiem noies que, com cada dia, ja he de córrer! (La Marta i la Consol, les meves compis de pis! una combinació de converses, opinions i moments, que fan que la convivència sigui molt gratificant).

I ja arribo al lab! Veig a l'Eva amb 3 *timers*, robant-li temps al temps per quadradar tots els horaris, miro el e-mail, i mentrestant acaben d'arribar la resta. Què noies, "smorzing"? Sí però ràpid, que avui hem de fer molta feina i a més tenim reunió! "Brillo, brillo"!! comencen ja els primers riures del matí, mentre comentem que la Quiroga ha enviat un e-mail dient que ve aquest cap de setmana! Ja podem agafar forces, no sé d' on treu tanta energia aquesta noia! (Vaig començar aquest camí amb l'Eva, la Merche i la Lídia, i l'Esther i la Quiroga formant part d'aquest inimitable *cluster*. Sou una combinació única, professionalment m'heu ajudat i ensenyat, i personalment m'heu fet viure aquest temps d'una manera especialment positiva, i poc a poc, compartint moltes hores i experiències us heu convertit en molt més que companyes de feina).

Un cafè ràpid envoltat d'anècdotes i riures, i cap al lab, ja ha arribat la Lídia, ens diu que se'n sentia venir pel passadís, li expliquem de què ràiem, i just entra el Graus! si hi ha algun moment en el que estem de disbauxa, sempre ens enganxa! Serà la llei de Murphy, o en realitat té un sisè sentit i no es vol perdre aquests moments??? Sigui com sigui, passa una per una i ens pregunta pels resultats, truca'm per rebel·lar! I els resultats de la immunoprecipitació, avui? Després em passo, truca'm eh! I aquí els tenim, els meus directors de tesi! als qui agraeixo infinitament la confiança que van dipositar en mi des del primer dia, i l'esforç i les ganes que heu posat en aquest projecte. El Graus, una ment clara i aparentment senzilla, quants cops hauré dit, com pot ser que no se m'hagi acudit, si sembla obvi! Sembla obvi, però no! darrera aquests raonaments es reflexa una combinació de saviesa i esforç, conceptes interrelacionats que de manera didàctica m'ha volgut transmetre en el dia a dia. I la Lídia, la meva postdoc! la casualitat de coincidir en unes escales va fer que uns segons més tard m'estigués fent una entrevista de feina! des d'aquell dia, sempre ha tingut un moment per deixar el que estava fent i dedicar-me uns instants, sorprendent-me amb els seus recursos i la capacitat autodidacta que té, m'ha transmès les seves opinions científiques i no científiques, i ha viscut el dia a dia d'aquesta tesi, ajudant-me a tirar-la endavant.

Bé continuem amb la feina, comencen a sonar tots els *timers* alhora! Com pot ser, si jo m'ho havia combinat perquè anessin sonant intercalats... i s'obra la porta, aquest cop és el Saiz, a corre-cuita perquè només té uns minuts, aprofita per mirar els resultats de la immuno, amb aquells números tant petits que fa la Merche... on havia deixat les ulleres... bé és igual, anem per feina, sabem alguna cosa de l'article? Jo crec que l'acceptaran però triguen molt en contestar.... Sí, sí, ho heu llegit bé, vam començar estudiant pacients amb encefalitis, gir inesperat, i cap a l'esclerosi múltiple, que semblava que en aquest estudi obtindrem resultats més profitosos. I aquí està l'Albert, dirigint un dels treballs d'aquest projecte, dedicant-me una part del seu temps i dels seus coneixements, contribuint així al desenvolupament d'aquesta tesi.

Vaig cap a la campana de cultius...good morning Myrna! que just està obrint la porta a l'Eugènia. Quins bons records, i quina sort vaig tenir! Les escapades científiques sempre resulten molt més fàcils i agradables si et trobes gent que fan que et sentis com a casa quan estàs en un indret llunyà. I allà estaven ells, la Myrna, el Dalmau, la Maartje, l'Eugènia amb la petita Eva i el Charly, que amb l'únic objectiu de facilitar-me l'estància allà em van rebre càlidament. I el que podia haver estat una pinzellada en el projecte acompanyada de bons records, ha acabat sent una part important d'aquesta tesi, i encara avui, el Josep i la Myrna em continuen transmeten els seus consells acompanyats de temps i esforços, en especial el Josep, una persona amb una constància increïble i una ment privilegiada, un expert en aquesta recerca.

Sento el soroll d'un plàstic que s'obre, reconec aquest soroll! alguna bona notícia (o senzillament una excusa qualsevol!) i quina millor manera de celebrar-ho que comprant alguna cosa per picar, patates, galetes o alguna xocolata! Vaig començar aquest camí sent l'única "chiquita", i acabo aquesta etapa envoltada de la Maria, la Núria, la Mar, la Thais, i el Jesús, sense oblidar els "convidats temporals" cadascun aportant aire fresc i alhora mantenint el bon ambient, una molt bona qualitat d'aquest lab! I de camí cap a l'ICFO, passant per Bergara, i fent guàrdia a pediatria, mentre analitzem LGII i fem uns quants ELISAS, sense adonar-nos ja som al migdia!

Avui dino a baix, i de camí al menjador em trobo amb el Xifró i la resta de gent de Bio-cellular. Quantes hores ens havien adoptat quan no teníem campana de cultius, i quins records! I és que... un cultiu primari sense una conversa amb el Xifró... és com un neurobassal sense B27, falta un component important!

Ja veig la immensa cua del menjador, la darrera persona és l'Emma, i mentre divaguem sobre alguna cosa d'una manera bastant similar, arriba la Joshu, és curiós que des de petites hègim escollit camins relativament paral·lels... i dic relativament perquè us asseguro que a mi mai se m'ha passat pel cap entrar en un equip de rugby! però és una combinació divertida!

I després de dinar, a rebel·lar els resultats de la immuno, després reunió, i tornem cap al lab, que he d'acabar de fer unes fotos. Avui no marxaré gaire tard, a tothom li ha agafat per quedar el mateix dia! A veure si puc veure'ls a tots! primer em passo a fer

un cafè amb la Pilar Armengol, la Rosa Faner i el Manel Joan, (ells són els “culpables” del meu primer contacte amb la ciència! Primer i no únic, sempre m’han deixat la porta oberta, i m’han anat filtrant savis consells camuflats entre cafès). Han quedat per la zona de Sant Pau, perfecte! Així em puc passar per immuno a saludar a la Silvia Vidal i la Bet Cantó, un altre pas important per estar convençuda de voler fer una tesi doctoral (dues científiques emprenedores, que hem van impregnar de recerca envoltada de bon ambient i motivació, essencial perquè la ciència t’atrapi en el seu món) i ja quan marxava em trobo a l’Oscar de la Calle, quina casualitat!, igual com les casualitats que tenen algunes converses, em va donar un bon consell en un moment molt oportú!

I xerrant xerrant amb uns i altres rebo un whatsapp de “Panalunya”! són el Jordi i la Irene que m’avisen que la Ivonne ja ha arribat i estan fent un beure amb la resta del grup en el bar que l’Adriana ha proposat. El Jordi i la Irene, per la ciència els vaig conèixer, i ara són com una brúixola indispensable que sempre envoltada de bon ambient em senyalen on està el Nord. El Nord i la Ivonne, que entre Panamà i Catalunya, sempre estás muy cerca, aunque estés un poco lejos. Ja es fa fosc, recollim i cadascú cap a una direcció, de camí cap a la moto,aprofito per parlar amb la Luci i la Noe (dos amigues de tota la vida, que són com una característica intrínseca de la meva vida) i el Mezqui! que per dir-ho d’algunha manera, “mismo fin diferentes métodos”.

Aparco la moto, i sona el mòbil, “mama mòbil”, un dia mai acaba de ser dia sense la trucada dels meus pares, que em pregunten com ha anat el dia. (i de la mateixa manera, mai hagués pogut fer una tesi sense el seu suport incondicional, des del primer dia han fet tot el possible perquè no em faltés de res, em van deixar escollir el meu camí, i em van brindar l’oportunitat de poder arribar fins aquí). I no podia faltar la pregunta dels divendres: vindràs a dinar demà? I diumenge? Diumenge sí, que així aprofito per veure a la resta de la família (formant un pack molt sólid, qualsevol dia és suficientment especial per trobar-nos).

I encara estic al carrer quan arriba l’Eugènia (personalitats diferents, però tant pròximes que alguns ens pregunten si som germanes), avui fem sopar a casa amb mix de gent, però abans hem quedat per fer un Skype amb la Laura (bogeria essencial acompanyada d’abraçades que arriben des de petites i llargues distàncies) i mentre sento per l’ordinador francès al Nico, arriba el Xavi (energia i vitalitat personificada que contagia en cada instant, capaç de sorprendre’m en qualsevol situació, m’ha anat brindant moments únics), i ja està proposant algun lloc peculiar per anar després de sopar on fan un concert.... mentre em pren el lloc per parlar amb la Laura. Mentrestant, van arribant la Carol, el Manils, la Mariona, el Victor, la Laia, la Marta, el Raimon, la Consol, l’Isaac i la Georgina (un combinat heterogeni de personalitats amb molta identitat! un “immunocomplexe” mai havia donat tant de sí!), i acaben d’arribar la Montse Biadiu, i tota aquella gent que injustament m’he oblidat d’anomenar i que heu aportat el vostre granet de sorra per que aquesta tesi s’omplís de bons records. I en mig de totes les converses i riures, la Carol m’ajuda a omplir les copies, i em començo a posar vermella, aix! Crec que em faré vella i em continuaré posant vermella cada cop

que noto que sóc el centre d'atenció, però aquest cop em ve de gust, em ve de gust proposar un brindis:

La ciència és com un camí d'alta muntanya, en el que moltes vegades no saps què vindrà després, poden haver-hi vistes precioses i esperançadores que donaran grans resultats, o un penya-segat en el qual després de recórrer un camí ben llarg s'ha de fer mitja volta i tornar a començar, però per una raó desconeguda això sempre va acompanyat de la il·lusió de creure que després del darrer experiment trobarem la fórmula màgica per contribuir a solucionar una part del món... No és un camí fàcil, i molts dies l'esperança queda emmascarada per un trencaclosques de solució desconeguda, però de sobte un experiment dóna un bon resultat, i com si d'un efecte dominó es tractés, les peces del trencaclosques comencen a encaixar! Avui, arribo a un dels meus destins, primera parada abans de tornar a emprendre el camí! Tant a nivell professional com personal he tingut la sort d'estar envoltada d'un entorn excepcional, i és per això que no trobo millor moment que avui, que he arribat al final o millor dit inici d'aquesta etapa, per agrair-vos a cadascun de vosaltres tot allò que m'heu aportat!

ÍNDEX

	Pàgina
I INTRODUCCIÓ	I
1. El concepte d'encefalitis	3
2. Encefalitis límbica paraneoplàsica	6
2.1. Descripcions inicials	6
2.2. Introducció al concepte de síndrome paraneoplàsica	8
2.3. Confirmació de l' encefalitis com una síndrome neurològica paraneoplàsica	11
2.4. Encefalitis límbica paraneoplàsica com a model d'autoimmunitat	12
2.5. Encefalitis i anticossos anti-Hu	14
2.6. Encefalitis i anticossos anti Ma-2	15
2.7. Anticossos onconeuronals	17
3. Mecanisme patogènic de l' encefalitis límbica paraneoplàsica	18
3.1. Concepte d'autoimmunitat	18
3.2. Mecanisme patogènic de les síndromes neurològiques paraneoplàsiques	21
4. Anticossos contra antígens de superfície	25
5. Encefalitis i anticossos contra el receptor de NMDA	27
6. Descripció d'altres anticossos contra antígens de membrana associats a encefalitis	31
6.1. Anticossos contra el receptor AMPA	33
6.2. Anticossos contra el receptor GABA _B	34
6.3. Anticossos contra el receptor metabotòpic mGluR5	35
6.4. Anticossos contra el complex proteic dels canals de potassi (LGII i Caspr2)	37
7. Mecanisme patogènic dels anticossos de membrana	43
8. Esclerosi múltiple i anticossos contra la contactina-2	45

8.1. Concepte d'Esclerosi múltiple	45
8.2. Mecanisme patogènic de l'esclerosi múltiple	47
8.3. Autoanticossos en l'esclerosi múltiple	50
8.3.1. <u>Anticossos contra la mielina</u>	50
8.3.2. <u>Anticossos contra altres components proteics del sistema nerviós central</u>	51
II OBJECTIUS	55
III PUBLICACIONS	59
Article 1	61
Article 2	69
Article 3	77
Article 4	89
IV RESULTATS I DISCUSSIÓ DE LES PUBLICACIONS	95
V CONCLUSIONS	111
VI BIBLIOGRAFIA	115
VII ANNEX I	127
<u>Descripció d'altres anticossos onconeuronals</u>	129
Anticossos anti-Yo (PCA-I)	130
Anticossos anti-Ri (ANNA-2, anti-NOVA)	131
Anticossos anti-amfifisina	132
Anticossos anti-CV2 (CRMP5)	133
Anticossos anti-Tr (PCA-Tr)	135
VIII ANNEX II	137
Resum dels articles en català	139
Anticossos contra el receptor GABA _B en l' encefalitis límbica i altres síndromes associades a anticossos anti-GAD (Article 1)	141

Perfil clínic de l' encefalitis associada a anticossos contra el receptor AMPA (Article 2)	142
Encefalitis i anticossos contra el DPPX, una proteïna associada a la subunitat Kv4.2 dels canals de potassi (Article 3)	143
Anàlisi dels anticossos contra epítops de superfície de la contactina-2 en l'esclerosi múltiple (Article 4)	144
IX ALTRES PUBLICACIONS	145

ABREVIACIONS

Ac(s)	Anticòs (Anticossos)
ADN	Àcid desoxiribonucleic
Ag(s)	Antigen (Antígens)
ARN	Àcid ribonucleic
APC	Cèl·lula presentadora d'antigen (de l'anglès, <i>Antigen Presenting Cell</i>)
BCR	Receptor dels limfòcits B (de l'anglès, <i>B cell receptor</i>)
BHE	Barrera hematoencefàlica
Caspr2	<i>Contactin-associated protein like-2</i>
CPCP	Càncer de pulmó de cèl·lula petita
CRMP	<i>Collapsin response mediator proteins</i>
DNER	<i>Delta/Notch-like epidermal growth factor-related receptor</i>
EAE	Encefalomielitis autoimmune experimental
EM	Esclerosi múltiple
EL	Encefalitis límbica
ELP	Encefalitis límbica paraneoplàsica
Fab	Part variable dels anticossos
Fc	Part constant dels anticossos
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
HLA	Gens dels antígens leucocitaris (de l'anglès, <i>Human leukocyte antigen</i>)
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
Kir4,1	<i>Inward rectifying potassium channel</i>
LCR	Líquid cefalorraquídi
LGII	<i>Leucine-rich glioma inactivated</i>
MBP	Proteïna bàsica de la mielina (de l'anglès, <i>Myelin basic protein</i>)
MHC	Complex major d'histocompatibilitat (de l'anglès, <i>Major histocompatibility complex</i>)
MOG	Glucoproteïna mielínica oligodendrocítica (<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>)
NF	Neurofascina
PLP	Proteolipoproteïna
R-AMPA	Receptor de l'àcid alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propiònic
R-GABA _B	Receptor gamma-amino-butíric (de l'anglès, <i>gamma aminobutyric acid</i>)

R-NMDA	Receptor N-metil-D-aspartat
R-mGluR1	Receptor metabotòpic del glutamat 1
R-mGluR5	Receptor metabotòpic del glutamat 5
RIA	Radioimmunoassaig
TCR	Receptor dels limfòcits T (de l'anglès, <i>T cell receptor</i>)
Tregs	Cèl·lules T reguladores
SN	Sistema nerviós
SNC	Sistema nerviós central
SN perifèric	Sistema nerviós perifèric
SNP	Síndromes neurològiques paraneoplàsiques
VGKC	Canal de potassi dependent de voltatge (de l'anglès, <i>Voltage-gated potassium channel</i>)
VGCC	Canal de calci dependent de voltatge (de l'anglès, <i>Voltage-gated potassium channel</i>)
VHS	Virus de l'Herpes simplex

I. INTRODUCCIÓ

I. El concepte d'encefalitis.

El terme encefalitis es refereix a la inflamació de la substància gris de l'encèfal. Es considera una malaltia febril aguda, acompanyada de diferents graus de disminució del nivell de la consciència, crisis epilèptiques, i defectes focals. Els símptomes i signes poden incloure convulsions, deliris, confusió, estupor o coma, afàsia o mutisme, signes focals motors, moviments involuntaris, atàxia i sacsejades miocloniques, paràlisi ocular i debilitat facial. El líquid cefalorraquidi (LCR) mostra pleocitosi, un augment dels limfòcits (entre 10-200 cèl·lules/mm³, els valors normals es troben entre 0 i 5 cèl·lules /mm³), i els estudis d'imatge de l'encèfal acostumen a ser normals, o posen en evidència la presència d'edema amb alteracions corticals (Ropper et al., 2007).

Durant la segona meitat del segle XX, amb els avanços en la microscopia electrònica i en els cultius cel·lulars, es va veure que la majoria de les encefalitis estaven causades per virus. Al 1941, Smith i el seu grup van descriure el primer cas d'encefalitis causada pel virus de l'Herpes Simplex (VHS) en un nounat (Smith et al., 1941), i al 1944 Zarafonetis i els seus col·laboradors van aïllar el virus en el teixit encefàlic d'un adult infectat (Zarafonetis and Smadel, 1944). Les característiques més rellevants eren la presència d'inflamació perivascular i petites hemorràgies de localització característica en el lòbul temporal en adults, i més tard (al 1968) Nahmias y Dowdle van demostrar que hi havia dos subtipus antigènics del VHS, el que va permetre aclarir l'epidemiologia de la infecció: el tipus 1 s'associava a l'encefalitis focal de nens i adults, i la tipus 2 a l'encefalitis neonatal difusa (Nahmias and Dowdle, 1968).

Tot i que nombrosos agents virals, bacterians, micòtics i parasitaris poden ser la causa de la síndrome de l'encefalitis, la més freqüent és la viral, i el 90% de les encefalitis víriques en adults estan causades pel VHS tipus 1, que és també la causa de les lesions herpètiques comuns de la mucosa bucal, tot i que curiosament les lesions bucales i l'encefalitis rarament coincideixen. El virus de tipus 2 també pot produir encefalitis aguda, quasi sempre es dóna en nounats i està relacionada amb la infecció herpètica genital de la mare. És possible que el VHS tipus 2 en l'adult causi meningitis asèptica. L'encefalitis causada pel VHS es presenta de forma esporàdica, en pacients de totes les

edats, és mortal en el 30-70% dels casos, i la majoria dels pacients que sobreviuen tenen seqüeles neurològiques greus (Ropper et al., 2007).

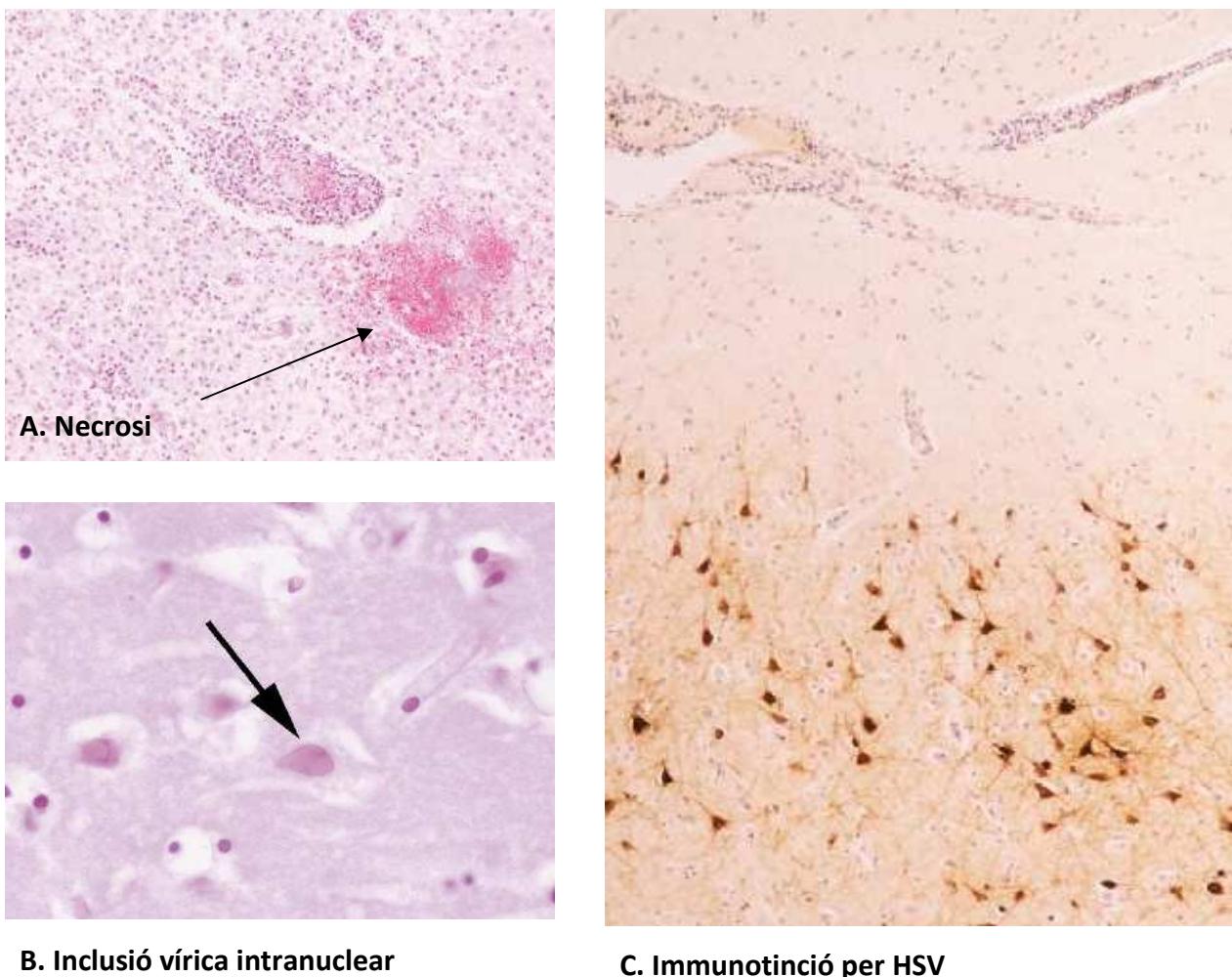
Els símptomes de l'encefalitis herpètica no es diferencien de la resta d'encefalitis provocades per altres agents, i el líquid cefalorraquidi (LCR) quasi sempre mostra pleocitosi, sobretot de limfòcits i en algunes ocasions també de neutròfils, tot i que en el 3-5% dels casos el LCR és normal durant els primers dies de la malaltia, i el contingut de proteïnes s'incrementa en la majoria dels casos. En una minoria de malalts en el LCR es troben eritròcits, el que reflexa la naturalesa hemorràgica de les lesions, però generalment els eritròcits són pocs o estan absents (Ropper et al., 2007).

El VHS pertany a la família dels herpesviridae, són virus grans, amb envolta i càpside icosaèdrica, àcid desoxiribonucleic (ADN) de doble cadena, i poden estar latents durant un temps en les cèl·lules del teixit nerviós i del sistema limfàtic. El VHS entra a l'organisme a través de la pell i mucoses, es multiplica en les cèl·lules epitelials, i després dissemina cap al sistema nerviós (SN), desencadenant diverses síndromes neurològiques com l'encefalitis herpètica, la gingivoestomatitis, la faringitis ulcerosa, l'herpes labial, i lesions oculars (Whitley and Roizman, 2001).

Les lesions adopten forma de necrosi hemorràgica intensa en les porcions inferiors i mitges dels lòbul temporal i parts mediorbitals dels lòbul frontals, s'estenen cap a munt al llarg de les circumvolucions del cíngol, i en ocasions cap a l'ínsula o parts laterals dels lòbul temporal, o s'estenen en sentit caudal cap al mesencèfal. Les lesions del lòbul temporal acostumen a ser bilaterals, però no simètriques. Aquesta distribució de les lesions és tant característica que el diagnòstic pot definir-se mitjançant la inspecció a simple vista, o mitjançant estudis d'imatge per la seva localització i aparença (**Figura I**). En etapes agudes de la malaltia, a més de les anomalies microscòpiques habituals de l'encefalitis aguda, es troben inclusions d'eosinòfils nuclears en les neurones i cèl·lules glials.

És possible que la via d'entrada del virus al sistema nerviós central (SNC) expliqui la localització única de les lesions en aquesta malaltia. Es suggereix que el virus està latent en els ganglis de Gasser i que al reactivar-se, la infecció podria estendre's al llarg de les fibres que innerven les leptomeninges de les foses anterior i mèdia (Ropper et al., 2007).

Figura 1. Aparència anatomo-patològica de les lesions causades per una encefalitis herpètica.



La figura **A** mostra l'aspecte necrossant de les cèl·lules infectades pel VHS, i en la mateixa figura també es veu prop de la necrosi una zona amb infiltrats inflamatoris. La figura **B** mostra l'aspecte d'una neurona infectada pel VHS, el nucli neuronal reflexa la inclusió intranuclear del virus. La figura **C** mostra una immunohistoquímica per detectar el VHS en la que es poden veure les neurones infectades pel virus (en marró), i també (en la part superior de la imatge) una part de les meninges amb infiltrats perivasculars.

Fins fa poc, es creia que totes les encefalitis eren d'origen viral, amb el pas del temps i els avanços científics es van plantejar altres etiologies, però l'única encefalitis que finalment es va demostrar que era autoimmunitària va ser l'encefalitis límbica paraneoplàsica. I més recentment han sorgit clares evidències d'un grup concret important d'encefalitis que probablement també siguin immunomediatades.

2. Encefalitis límbica paraneoplàsica.

2.1 Descripcions inicials.

La primera descripció d'encefalitis límbica va ser l'any 1960, quan Brierley i els seus col·laboradors van publicar el cas de 3 pacients amb encefalitis aguda que presentaven inflamació dels lòbuls temporals implicant estructures límiques. En aquella època encara no es coneixia el terme encefalitis límbica, i Brierley va proposar el nom de “lòbul límbic” per descriure les estructures que estaven més afectades per la inflamació en els seus pacients (Brierley et al., 1960).

El pacient 1 era un malalt de 53 anys, que tenia depressió severa, agitació, comportaments anormals, i pèrdua de consciència transitòria, però a part de les tremolors a les mans, no suggeria signes neurològics anormals. Al cap d'uns mesos, presentava nàusees, crisis focals, cefalees ocasionals, i pèrdues de consciència acompanyades de convulsions. Les proves de laboratori eren negatives, l'encefalograma era normal, i l'anàlisi del LCR també era normal. La memòria cada cop era més deficient, estava més desorientat, i continuaven les cefalees periòdiques. L'electroencefalograma en aquest moment mostrava alteracions en les àrees frontotemporals, i neurològicament els símptomes incrementaven (desorientació, tremolors i alteracions en la parla, entre altres), finalment va passar a un estat de coma, i va morir al cap de cinc hores. L'autòpsia no mostrava cap senyal externa de la malaltia, i a part d'una bronquitis purulent no es va trobar cap altre factor que pogués ser la causa de la seva mort. S'observava inflamació sobretot en l'hipocamp i nuclis amigdaloides, i hi havia infiltrats inflamatoris al cervell, els ventricles laterals estaven lleugerament dilatats, i les fibres superficials del subiculum mostraven desmielinització parcial. El gir dentat estava danyat, i hi havia formació de vacuolets en les neurones danyades.

El pacient 2 era un malalt de 58 anys, que va ingressar amb un historial d'infecció respiratòria un mes abans, seguit de depressió, i es queixava de cefalees periòdiques i inestabilitat al caminar. Prèviament havia patit una intoxicació per gas, i des de llavors havia estat subjecte a brots de bronquitis i pneumònia. Estava ansiós i agitat, però l'examinació neurològica va ser completament normal. L'estat mental del pacient es caracteritzava per desorientació i al·lucinacions, i també tenia problemes en la parla, marxa inestable, i incontinència. El LCR mostrava pleocitosi de limfòcits (146

cèl·lules/mm³). Finalment va morir. Les causes de la seva mort es van atribuir a la bronquitis crònica i broncopneumònia, acompanyada d'encefalitis subaguda. En l'anàlisi *post-mortem* els pulmons reflectien la bronquitis crònica bilateral i emfisema, i l'anàlisi dels altres òrgans, a part del cervell, només mostraven alteracions resultants de la congestió venosa. Al cervell cridava l'atenció l'aspecte esponjós i el poc contrast entre la substància blanca i gris, i les estructures estaven poc definides. L'evidència d'encefalitis es dispersava per tot el cervell, però era més intensa en la regió del lòbul temporal i estriat, hi havia nombrosos infiltrats limfocitaris a nivell perivascular especialment en la zona de l'ínsula, hipocamp i lòbuls temporals en general, també hi havia presència de cèl·lules plasmàtiques, degeneració, i pèrdua de cèl·lules nervioses preferentment en l'amígdala, acompanyat d'una intensa reacció glial. Els danys afectaven principalment a la substància gris, tot i que també hi havia afectació de la substància blanca.

El pacient 3 es va presentar amb dolor als braços i a les espalles i l'historial clínic suggeria una infecció recent, que al cap de poques setmanes s'havia complicat en sensació de cansament, depressió, desorientació i problemes de memòria. Es va sospitar d'un tumor pulmonar, que no es va confirmar *post-mortem*. La seva mort es va atribuir a una broncopneumònia, i l'autòpsia revelava la presència d'infiltrats limfocitaris, nòduls limfoides fibrosos i inflamació als lòbuls temporals, la substància blanca estava lleugerament inflamada però no mostrava destrucció de la mielina. Els canvis histològics es concentraven a l'hipocamp i a l'amígdala, i el patró arquitectònic estava completament alterat per causa inflamatòria amb una elevada pèrdua neuronal (Brierley et al., 1960).

Els tres malalts presentaven demència progressiva, inflamació en àrees molt concretes del cervell, i van acabar en coma. En el moment de la malaltia es va pensar que podia tractar-se d'una encefalitis viral, però les proves d'aglutinació eren negatives, i Brierley insistia en que tot i que no s'havia pogut identificar l'agent causant de la malaltia, els tres pacients tenien una aparença histològica molt similar a la de les encefalitis subagudes sense hemorràgia ni necrosi, i remarcava que la inflamació es concentrava en les parts del "lòbul límbic", i a més no es tractava de casos aïllats, tenien certa similitud amb altres casos publicats recentment, diagnosticats com encefalitis aguda o

subaguda. Finalment els tres pacients es van diagnosticar com encefalitis subaguda concentrada en àrees límbiques del cervell. I Brierley va utilitzar el terme “lòbul límbic” per fer referència a l’uncus, amígdala, hipocamp i gir dentat, córtex insular, i cíngul (Brierley et al., 1960).

2.2 Introducció al concepte de síndrome paraneoplàsica.

Dos dels tres malats descrits per Brierley suggerien tenir càncer, però no es va arribar a confirmar. Un any després, Russell va observar que hi havia síndromes neurològiques que es desenvolupaven en pacients amb carcinomes, i molts d'aquests malats presentaven dany neuronal tot i que el tumor no es localitzés en el SN, a més tenien infiltrats perivasculars i formació de nòduls glials (Russell.DS, 1961). I al 1965 Cowen i el seu grup van publicar un article titulat “*Encephalopathy associated with carcinoma*” en el que describia el cas d'una dona de 61 anys amb problemes de memòria, confusió, dificultats per treballar i extremitats adormides, LCR normal, lesions cerebrals només en la substància gris de l'àrea límbica accompanyades d'infiltrats limfocitaris i proliferació glial, i un petit carcinoma de pulmó sense complicacions metastàsiques (Yahr et al., 1965), però malgrat les descripcions suggerien que podia haver-hi una relació entre l'encefalopatia i el carcinoma, no descartaven la possibilitat de que les característiques patològiques fossin el resultat d'una infecció viral.

Paral·lelament, Guichard i Vignon al 1949 van proposar utilitzar el terme paraneoplàsia en lloc de neoplàsia, per descriure els símptomes i les diferents complicacions de causa desconeguda però associades a la presència d'un tumor (Guichard and Vignon, 1949). Tot i que el mecanisme pel qual es desencadenava la clínica dels malalts es desconeixia, les proves per determinar l'agent viral eren negatives, i van observar que no era per causa directa de la invasió del tumor al SN, ni per infeccions, ni pel tractament. La

neuropatia sensitiva subaguda, va ser una de les primeres síndromes en les que es va acceptar la hipòtesi de la paraneoplàsia, considerant la malaltia com una conseqüència remota d'un carcinoma. Generalment es caracteritzava per un càncer de pulmó de cèl·lula petita (CPCP), acompanyat de la destrucció de les neurones del gangli raquidi, i ocasionalment infiltrats inflamatoris (Denny-Brown.D., 1948).

Al mateix temps, alguns investigadors van començar a pensar que les neurones podien ser la diana antigènica d'un atac autoimmune, i Wilkinson i Zeromski al 1965, van detectar la presència “d'anticossos anti-cerebrals circulants” en pacients amb neuropatia sensitiva carcinomatosa (Wilkinson and Zeromski, 1965). Però malauradament, diversos investigadors van intentar reproduir-ho i no ho van aconseguir, no va ser fins als anys 80 quan aquests anticossos (Acs) “anti-cerebrals” es van anar descrivint, i es va utilitzar el terme “Ac onconeural” per definir aquells Acs produïts pel propi pacient, que reconeixien antígens (Ags) propis (receptors o proteïnes principalment) expressats pel tumor i pel teixit nerviós. A finals del segle XX, gràcies als estudis de caracterització es va observar que els Acs no eren ambiguos, i van concloure que hi havia diferents Acs, cadascun d'ells amb especificitat antigènica, i quasi sempre es trobaven associats a un perfil clínic característic, i en conseqüència associats preferentment a unes determinades síndromes neurològiques paraneoplàsiques i a un determinat grup de tumors (Dalmau and Rosenfeld, 2008), (Graus et al., 2004).

Actualment el terme síndrome neurològica paraneoplàsica (SNP) es refereix a un conjunt de malalties que presenten símptomes o signes neurològics a conseqüència d'una disfunció del SN, per causa indirecta de la presència d'un tumor no neuronal. Poden afectar a qualsevol part del SN, algunes síndromes afecten només a un àrea concreta (per exemple l'encefalitis límbica), altres afecten a un tipus de cèl·lula en concret, i en altres casos afecten a múltiples àrees. Les síndromes neurològiques acostumen a aparèixer mesos o incús un any abans de la detecció del tumor, i l'anàlisi del LCR revela una lleugera pleocitosi (de 30 a 40 cèl·lules/ mm³), un lleuger increment del nivell de proteïnes, i elevats nivells d'Acs contra Ags onconeuronals. Les SNP són poc freqüents, però el fet de que cada Ac s'associi a un determinat tipus de càncer i a unes determinades característiques clíniques (**Taula I**), permet dirigir el diagnòstic, i

això és important perquè en la majoria de casos permeten detectar el càncer en un estadi molt inicial, en el que la possibilitat de cura és major tant a nivell neoplàsic com per la síndrome neurològica (Darnell and Posner, 2003).

Taula1. Síndromes neurològiques paraneoplàsiques associades a anticossos onconeuronals.

Síndrome	Tumor associat	Anticòs
Degeneració cerebel·losa	Mama, ovari	Anti-Yo
	Hodgkin	Anti-Tr
	Pulmó	Anti- CCVD*, SOX1
Encefalitis límbica	CPCP	Anti-Hu
	Testicle	Anti-Ma2
Encefalitis de tronc cerebral	CPCP	Anti-Hu
Opsoclonus/mioclonus	CPCP, neuroblastoma	-
	Mama	Anti-Ri
Mielopatia necròtica	Pulmó, limfoma	-
Neuropatia motora	Limfoma	-
Neuropatia sensitiva	CPCP	Anti-Hu, Anti-CV2
Neuropatia autònoma	CPCP	Anti-Hu
Neuropatia mixta	Pulmó, limfoma	-
Multineuritis	Pròstata, ronyó	-
Síndrome de la persona rígida	Mama	Anti-Amfifisina I
Eaton-Lambert	CPCP	Anti-CCVD*, SOX1
Dermatomiositis	Mama, pulmó	-

CCVD* Canal de calci dependent de voltatge

2.3 Confirmació de l'encefalitis com una síndrome neurològica paraneoplàsica.

Malgrat l'aparició del concepte de paraneoplàsia i la hipòtesi d'un origen autoimmune en algunes malalties com l'encefalopatia sensitiva subaguda, i l'observació de càncer en alguns malalts amb encefalitis, a la presència del carcinoma no se li donava la importància que en realitat tenia, i la hipòtesi de l'encefalitis d'etologia autoimmune associada a càncer no aconseguia desplaçar la creença de l'etologia viral. Fins que al 1968, Corsellis va associar, sense saber molt bé la causa de l'associació, l'"encefalitis límbica" i el carcinoma, i va reconèixer l'encefalitis límbica paraneoplàsica (ELP) com una entitat (Corsellis et al., 1968).

Durant tot aquest temps es creia en una hipòtesi viral, els autors no associaven el càncer a l'origen de l'encefalitis, però consideraven que la presència d'un carcinoma i la inflamació eren característiques que s'havien de comentar en les descripcions dels pacients. Brierley insistia en la reacció inflamatòria als hemisferis, Verhaart descrivia la degeneració de la substància gris del SNC en la carcinomatosis (Verhaart, 1961), Ulrich donava suport a la hipòtesi de la síndrome neurològica com un efecte remot d'un tumor maligne (Ulrich et al., 1967), i el grup de Cowen publicaven el treball de l'encefalopatia associada al carcinoma, però tot i així no es descartava que la causa fos viral (Yahr et al., 1965).

Per contra, Corsellis veia clares similituds amb altres malalties com la degeneració cerebel·losa, o la neuropatia sensitiva subaguda, en les que inicialment s'havia descrit que els malalts tenien carcinoma i inflamació, i finalment s'havien considerat síndromes paraneoplàsiques. I també veia l'evidència que suggerien les descripcions d'un petit nombre de pacients amb un carcinoma, que acostumava a ser bronquial, i reaccions inflamatòries o degeneratives en el sistema límbic. Finalment va utilitzar el terme "encefalitis límbica" (EL) per descriure el perfil d'aquells pacients amb encefalitis i afectació principalment al "lòbul límbic". Juntament amb el seu equip, van definir l'EL com una entitat aïllada, que s'associava a carcinoma i inflamació, i malgrat no tingués una explicació de la causa que la desencadenava, ni del mecanisme, postulava que l'etologia era paraneoplàsica, i no viral (Corsellis et al., 1968).

2.4 Encefalitis límbica paraneoplàsica com a model d'autoimmunitat.

Després de les descripcions de Corsellis, va cobrar força la hipòtesi de l'EL com una síndrome paraneoplàsica que afectava principalment a les àrees límboiques, i també va cobrar força l'estudi realitzat tres anys abans per Wilkinson i Zeromski en el que van estudiar el cas de 34 malalts amb síndromes neurològiques i algun càncer no metastàsic. Per la tècnica d'immunofluorecència sobre extractes de cervell, van detectar Acs en el sèrum de 5 malalts, dels quals 4 s'havien diagnosticat prèviament de neuropatia sensitiva paraneoplàsica (Wilkinson and Zeromski, 1965). Els Acs presents en aquells pacients reaccionaven contra components citoplasmàtics (retrospectivament es va veure que la reactivitat que ells observaven era principalment contra el nucli de les neurones) però, tot i les noves descripcions i el canvi de mentalitat, el fet de que altres investigadors no haguessin pogut reproduir els resultats de Wilkinson i Zeromski i ningú més hagués detectat la presència d'"Acs anti-cerebrals circulants" deixava un buit en la hipòtesi de que la causa fos autoimmune, de manera que durant un temps van continuar les dues hipòtesis. Finalment, 20 anys més tard, Graus, Posner i el seu grup, van detectar en 2 pacients amb neuropatia sensitiva subaguda i CPCP la presència d'Acs que reaccionaven contra el nucli neuronal (Graus et al., 1985), i més tard els van detectar en 2 pacients més (Graus et al., 1986). Per un costat aquests autors demostraven la presència d'un Ac específic d'un tipus cel·lular en el sèrum de 4 malalts amb neuropatia sensitiva subaguda, i per un altre costat, degut a aquesta característica d'especificitat antigènica, el grup de Posner proposava la detecció d'aquests Acs com una eina que ajudaria a definir el diagnòstic d'un grup concret de pacients. Posner i el seu grup van utilitzar el terme "Ac onconeural", per descriure els Acs específics d'un subtipus cel·lular, d'origen autoimmune, associats a la neuropatia sensitiva subaguda. Anteriorment aquest terme havia estat introduït prèviament per immuno-oncòlegs per descriure la diana antigènica present en els teixits ectoneurodermals i en el tumor, basant-se entre altres, en les descripcions de Seeger que demostraven que nombrosos tumors d'origen neuroectodèrmic, o mesodèrmic, expressaven "Ags onconeuronals" (Seeger et al., 1979).

Paral·lelament va sorgir el concepte d'encefalomielitis paraneoplàsica, que es caracteritzava per la pèrdua neuronal i infiltrats inflamatoris en el SNC, i englobava diverses síndromes. La localització i severitat de la pèrdua neuronal predeia la simptomatologia clínica dels pacients, d'aquesta manera, si afectava principalment a l'hipocamp els malalts tenien EL, si afectava al tronc cerebral tenien encefalitis de tronc cerebral, si afectava a la medul·la tenien neuropatia motora, si afectava als ganglis raquidis posteriors tenien neuropatia sensitiva, i si afectava al plexe mientèric tenien una pseudobstrucció intestinal crònica (**Taula 2**). La presentació clínica era subaguda, generalment causava disfuncions neurològiques severes, i en el 70% dels casos les disfuncions neurològiques precedien al diagnòstic del CPCP (Henson and Urich 1982). La majoria dels pacients amb encefalomielitis paraneoplàsica tenien Acs anti-Hu en el sèrum i LCR (Graus et al., 2001).

Taula 2. Encefalomielitis paraneoplàsica.

Localització (pèrdua neuronal)	Síndrome clínica
Hipocamp	Encefalitis límbica
Tronc cerebral	Encefalitis de tronc cerebral
Medul·la	Neuropatia motora
Gangli raquidi posterior	Neuropatia sensitiva
Plexe mientèric	Pseudobstrucció intestinal crònica

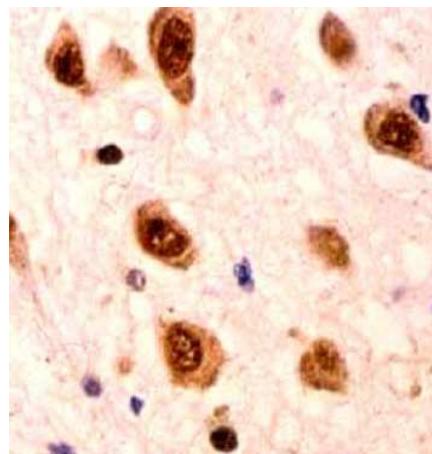
Modificació de la taula extreta de la publicació: Graus et al. *Brain*, 2001; 124(6):1138-48.

2.5 Encefalitis i anticossos anti-Hu.

Al 1985 Graus, Posner i el seu grup van detectar autoanticossos que immunoreaccionaven majoritàriament contra un Ag nuclear de neurones situat en diferents àrees del cervell (còrtex, hipocamp, putamen, tàlam, hipotàlam, mesencèfal, medul·la i cerebel, entre altres), i posteriorment quan els van caracteritzar, van veure que es tractava d'immunoglobulines d'isotip G (IgG) policlonals (Graus et al., 1985). Inicialment aquests Acs es van associar a la neuropatia sensitiva subaguda i carcinoma de pulmó, i els resultats suggerien que es tractava d'una proteïna que estava present en el tumor i en el SNC, però més tard es va veure que aproximadament el 50% dels pacients amb encefalitis i CPCP també tenien aquests Acs en el sèrum i LCR (Alamowitch et al., 1997).

L'Ag desconegut contra el qual tenien reactivitat els Acs s'anomenava Hu, una proteïna d'unió a l'àcid ribonucleic (ARN), de 35-40KDa, expressada en el nucli, i en menor grau en el citoplasma, de les neurones del SNC i SN perifèric (sistema nerviós perifèric), i també expressada en el tumor. Té una elevada homologia amb la proteïna Elav de la *Drosophila*, en la que té una funció crítica pel desenvolupament del SN, i s'expressa durant l'embriogènesi en el SN dels mamífers, on s'ha demostrat que juga un paper important en la diferenciació neuronal (Szabo et al., 1991).

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-Hu



Fotografia realitzada per nosaltres

Zhu i el seu grup van demostrar el mecanisme pel qual les proteïnes Hu controlen la diferenciació i el manteniment del fenotip neuronal, actuen regulant el processament alternatiu de l'ARN missatger neuro-específic, promovent es pugui transcriure l'ARN que codifica per la producció de la proteïna CGRP (Proteïna Relacionada amb el Gen de la Calcitonina), i alhora bloquejant la via del processament alternatiu que permetria la producció de l'hormona calcitonina (Zhu et al., 2006).

Però malgrat l'expressió antigènica de la proteïna Hu per part de les cèl·lules i del tumor, no hi ha cap evidència que els Acs anti-Hu siguin els responsables del dany neuronal.

2.6 Encefalitis i anticossos anti-Ma2.

Dalmau i els seu grup van observar que el 80% dels casos d'ELP s'associaven a CPCP i la meitat tenien Acs anti-Hu, i en el 20% restant el càncer més freqüent era el testicular. Aquests investigadors al 1999 van detectar un nou autoanticòs en el sèrum i LCR de 10 dels 13 malalts amb encefalitis paraneoplàsica i càncer testicular, i van observar que només estava present en els casos paraneoplàsics (Dalmau et al., 1999), (Voltz et al., 1999). L'Ag contra el qual tenien reacció aquests Acs s'anomenava Ma2.

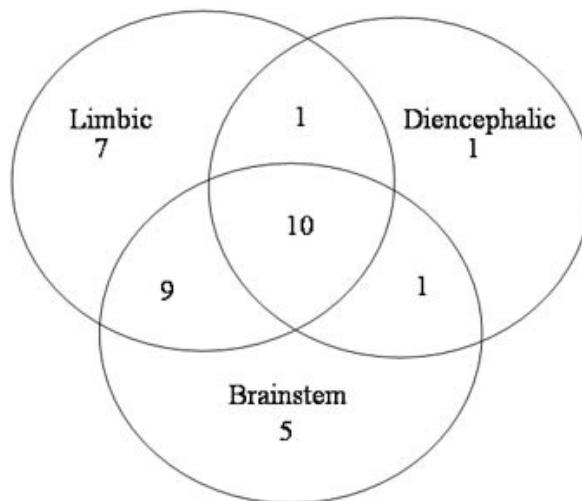
Els Acs anti-Ma immunoreaccionen donant un patró puntejat nuclear i citoplasmàtic en les neurones del cerebel. La diana antigènica d'aquests Acs és l'extrem N-terminal de les proteïnes neuronals Ma: Ma1 (37KDa), Ma2 (o també anomenat Ta, 40KDa) i Ma3 (53KDa), però Ma2 és l'Ag majoritari. Les proteïnes Ma s'expressen en el cervell i en el tumor, i es creu que la seva funció està involucrada en la biogènesi de l'ARN missatger (Rosenfeld et al., 2001), (Voltz et al., 1999).

La majoria dels pacients que presenten Acs anti-Ma2 acostumen a tenir encefalitis amb afectació principalment del sistema límbic, hipotàlem i tronc cerebral. La combinació dels diferents símptomes i àrees afectades dóna diferents SNP, i la clínica dels malalts

es relaciona amb la disfunció d'aquestes àrees (somnolència, cataplexia, hiperàlgia, déficits d'hormones relacionades amb la pituïtària, etc.). En malalts de menys de 50 anys, els Acs anti-Ma2 s'associen al càncer de cèl·lules germinals testiculars, mentre que en malalts de més edat i en dones el càncer més freqüent és el CPCP i el càncer de mama. Afortunadament, més del 35% dels pacients amb encefalitis i Acs anti-Ma2 responen bé al tractament (Rosenfeld et al., 2001), (Dalmau et al., 2004).

La **Figura 2** mostra la distribució de les síndromes predominants en aquests pacients segons un estudi realitzat en 34 malalts amb encefalitis i Acs anti-Ma2. 21 patients van desenvolupar símptomes multifocals implicant estructures límbiques, diencefàliques o de tronc cerebral, mentre que altres van desenvolupar disfuncions unifocals implicant aquestes àrees: 7 EL, 1 diencefàlica, i 5 encefalitis de tronc cerebral. 20 patients tenien encefalitis de tronc cerebral amb EL i/o diencefàlica.

Figura 2.



Dalmau et al. Brain, 2004; 127(8):1831-44

2.7 Anticossos onconeuronals.

Els Acs onconeuronals són excel·lents marcadors diagnòstics de moltes SNP, per un costat ajuden al diagnòstic de la síndrome, i per un altre costat guien en el tipus de càncer que pot tenir el pacient. La diana antigènica (autoantígens) són proteïnes intracel·lulars, i la majoria tenen la funció de modular processos cel·lulars com la replicació i transcripció del ADN o ARN (ja sigui per unió directa, o interaccionant amb factors que actuen sobre aquestes molècules), diferenciació, migració i apoptosis, i s'expressen de forma normal en el teixit nerviós, i de forma anòmala en el tumor. Els Acs que reaccionen contra aquests autoantígens són IgG, polyclonals, la freqüència d'expressió en malalts amb SNP és alta, i es produeix una síntesi intratecal d'aquests Acs durant el desenvolupament de la síndrome. En general els malalts tenen una resposta poc satisfactòria al tractament d'immunoteràpia.

Tot i així, el diagnòstic d'un pacient no es podia basar només en la detecció dels Acs onconeuronals, ja que en alguns malalts no se'ls hi detectaven, ja fos perquè no en tenien, o perquè els títols eren molt baixos i les proves de laboratori no eren suficientment sensibles per detectar-los, però degut a que eren molt útils per ajudar en el diagnòstic, es van anar estudiant al llarg del temps, i finalment es van caracteritzar extensament i es van establir associacions freqüents Ac-SNP (**Taula 3**).

Taula 3. Anticossos contra antígens intracel·lulars.

Anticòs	Any	Síndrome neurològica	Tumor
Anti-Yo	1983	Degeneració cerebel·lar	Ovari, mama
Anti-Hu	1985	Encefalomielitis, neuropatia sensitiva subaguda	CPCP
Anti-Ri	1988	Degeneració cerebel·lar, Opsoclonus	Mama, ginecològic
Anti-amfifisina	1993	Síndrome de la persona rígida i encefalomielitis	Mama, CPCP
Anti-CV2	1996	Encefalomielitis, corea, neuritis òptica, uveïtis,	CPCP, timoma,
Anti-Tr	1997	Degeneració cerebel·lar	Limfoma de Hodgkin
Anti-Ma2	1999	Encefalitis límbica, hipotalàmica i tronc cerebral	Testicular (Ma2)

Modificació de la taula extreta de la publicació Rosenfeld et al., *Oncologist*, 2010; 15(6):603–17.

La resta dels autoanticossos associats a Ags intracel·lulars es van identificar seguint la mateixa estratègia que en el cas de l’Hu i el Ma2, i la descripció detallada d’aquests es troba en l’annex I.

3. Mecanisme patogènic de l’encefalitis límbica paraneoplàsica.

3.1 Concepte d’autoimmunitat.

Les cèl·lules del sistema immunitari passen per diversos processos per tal de ser educades per saber diferenciar les molècules pròpies de l’organisme, davant les quals seran tolerants, de les molècules externes i potencialment nocives, enfront les quals reaccionaran per eliminar-les. L’autoimmunitat es defineix com una resposta immunològica del sistema immunitari adaptatiu contra Ags propis, que es produeix quan fracassen els mecanismes d’autotolerància.

Igual com la resta de cèl·lules sanguínies, els limfòcits B i T provenen de les cèl·lules pluripotencials de la medul·la òssia, i després de la seva formació passen per diverses fases complexes de diferenciació i maduració durant les quals adquireixen les característiques funcionals i fenotípiques de cèl·lules madures. La maduració dels limfòcits B i T consta d’una sèrie d’estadis seqüencials en els que les cèl·lules experimenten diversos canvis cel·lulars i genètics: primer es produeix una proliferació i diferenciació en els teixits limfoides centrals (medul·la òssia i timus), després es dóna l’expressió dels receptors, que es produeix per un procés de recombinació gènica aleatòria, generant així un repertori divers però alhora potencialment autorreactiu, i per últim es dóna la selecció del repertori madur, en el qual un cop els limfòcits expressen els seus receptors antigènics, passen per un “control”, un procés de selecció per tal d’eliminar aquells limfòcits que reaccionen contra molècules pròpies. D’aquesta manera aquells limfòcits que siguin autotolerants a les molècules pròpies sobreviuran, i

adquiriran les característiques funcionals i fenotípiques per transformar-se en cèl·lules madures (Abbas et al., 2007).

Els limfòcits B adquiereixen la maduresa en la medul·la òssia, on es fa una selecció positiva del repertori de limfòcits B. Els limfòcits T en canvi, adquiereixen la maduresa en el timus. D'aquesta manera, els limfòcits T immadurs surten de la medul·la òssia i migren cap al timus, on acabaran de madurar i on es produirà el procés de selecció. El procés de selecció dels limfòcits T és similar al dels limfòcits B, però tenen una sèrie de característiques pròpies que els hi permet tenir un repertori de cèl·lules T-CD4 i T-CD8. La selecció positiva, que es dóna tant en els limfòcits T com en els limfòcits B, i s'explica mitjançant un model basat en la interacció entre la molècula del complex major d'histocompatibilitat (MHC, de l'anglès *Major histocompatibility complex*), que té la funció de presentar Ags, i el receptor dels limfòcits T o B (TCR, de l'anglès *T-cell receptor*, o BCR *B-cell receptor*). Una baixa interacció entre el MHC i el TCR/BCR en el timus/medul·la òssia permet la supervivència dels limfòcits (selecció positiva), no obstant si el reconeixement del pèptid supera el llindar, en el mateix timus/medul·la òssia es dóna un procés d'apoptosi cel·lular normal, i s'elimina la cèl·lula autoreactiva, que és el que es coneix com a selecció negativa. En el cas dels limfòcits T, quan es produeix la selecció positiva aquestes cèl·lules expressen en la seva superfície el TCR, i també els correceptors CD4 i CD8, de manera que després passen per una maduració fenotípica i funcional amb l'objectiu de definir-se com a T-CD4, i adquirir la capacitat de sintetitzar citocines i expressar molècules efectores com el lligand CD40 que li permetrà "ajudar" als limfòcits B i macròfags, o definir-se com a T-CD8, i adquirir la capacitat de produir molècules capaces de destruir altres cèl·lules citotòxiques.

Un cop han superat el procés de selecció, els limfòcits T/B madurs no autoreactius abandonen el timus/medul·la òssia, entren en circulació i van cap als òrgans limfoides perifèrics on resideixen. Aquestes cèl·lules madures reben el nom de "limfòcits verges" o pre-immunes (*naive*), i tenen la funció de reconèixer antígens i iniciar la resposta immune adaptativa, d'aquesta manera quan es dóna el reconeixement de l'Ag i es produeixen altres estímuls, s'activen i es diferencien a cèl·lules efectores i de memòria.

Gràcies al desenvolupament dels models animals i la identificació dels gens que poden representar una predisposició a l'aparició d'algunes malalties autoimmunes [un dels gens principals és l'HLA-DR (Quandt et al., 2012) o l'HLA-DQ (Larizza et al., 2012), haplotips humans del MHC de classe II], els coneixements sobre l'autoimmunitat han avançat molt aquests últims anys, però tot i així l'etiologia de la majoria de malalties autoimmunes encara es desconeix. Per contra, hi ha diverses hipòtesis sobre els mecanismes que poden desencadenar-ho:

Un d'ells seria la **insuficiència o trencament dels mecanismes d'autotolerància**. El sistema immunitari utilitza diferents estratègies per evitar l'autoreactivitat, de manera que la disfunció d'aquests mecanismes podria contribuiria a l'aparició de l'autoimmunitat (Ring and Lakkis, 1999), (Mueller, 2010):

- La selecció limfocitària (explicada anteriorment) té l'objectiu d'eliminar els limfòcits autorreactius. Errades en la tolerància central (en la medul·la òssia o timus) implicaria la presència de limfòcits reactius en la perifèria, tot i que aquest fet per sí sol no desencadena l'autoimmunitat. L'estratègia de l'anèrgia clonal (que és la inducció d'un estat cel·lular no reactiu que es produeix quan el reconeixement antigènic per part de les cèl·lules T es dóna en absència d'una co-estimulació) inactiva aquestes cèl·lules T impedint que proliferin i que es diferencien a cèl·lules efectores. D'aquesta manera, es creu que diversos factors com molècules coestimuladores, proinflamatòries, citocines, etc. en aquestes situacions contribuirien a crear un entorn inflamatori adequat que podria desencadenar una resposta autoimmune.
- La disruptió de la tolerància perifèrica que inclouria alteracions en els mecanismes de maduració limfocitària, activació cel·lular inadequada, i alteracions en l'apoptosi, també contribuirien a l'aparició de l'autoimmunitat.
- Els factors genètics associats a diversos gens, com el MHC, representen també una susceptibilitat addicional al desenvolupament de l'autoimmunitat.
- Una alteració en la correcta activació i funcionament de les cèl·lules i molècules reguladores, com els factors supressors, o les cèl·lules T-reguladores (Tregs), podrien estimular la reacció immunològica contra Ags propis i no

propis. L'acció supressora sobre les cèl·lules autorreactives és també una estratègia d'autotolerància.

I una altra possibilitat són les infeccions víriques i bacterianes, que podrien contribuir al desenvolupament de l'autoimmunitat degut al **mimetisme molecular**. En molts pacients, l'inici d'una malaltia autoimmune acostuma a associar-se a malalties infeccioses, i en molts d'aquests casos els microorganismes no es troben en les lesions, o ni tant sols es detecten, fet que suggereix una etiologia autoimmune. Els limfòcits T reaccionarien contra un epítop propi, degut a que és estructuralment molt similar a epítops derivats de patògens, i en conseqüència es desencadenaria una resposta autoimmune (Cusick et al., 2012), (Ring and Lakkis, 1999).

3.2 Mecanisme patogènic de les síndromes neurològiques paraneoplàsiques.

La inflamació aguda és la primera resposta als estímuls nocius, i implica l'alliberació coordinada de components sanguinis (plasma i leucòcits). Durant molt de temps es pensava que el sistema immunitari no tenia accés al SNC, però actualment s'accepta que també s'hi donen respostes immunològiques i inflamatòries davant molts estímuls (infeccions, accidents traumàtics, atacs epilèptics, isquèmia, etc.). La inflamació en el SNC està caracteritzada per la infiltració de cèl·lules immunitàries circulants, principalment limfòcits, acompanyat de l'activació de cèl·lules endotelials, microglia i astròcits.

Per l'inici i desenvolupament d'una resposta immune adaptativa es requereix l'activació i interacció de diferents molècules del sistema immunitari. Hi ha dos tipus de resposta immune adaptativa: la resposta humoral, mediada principalment pels limfòcits B i la seva secreció d' Acs, i la resposta cel·lular, mediada principalment pels limfòcits T. Els Acs reconeixen els Ags microbians que provenen de l'exterior, neutralitzen la capacitat infecciosa dels microorganismes i els eliminan per diferents mecanismes efectors (com

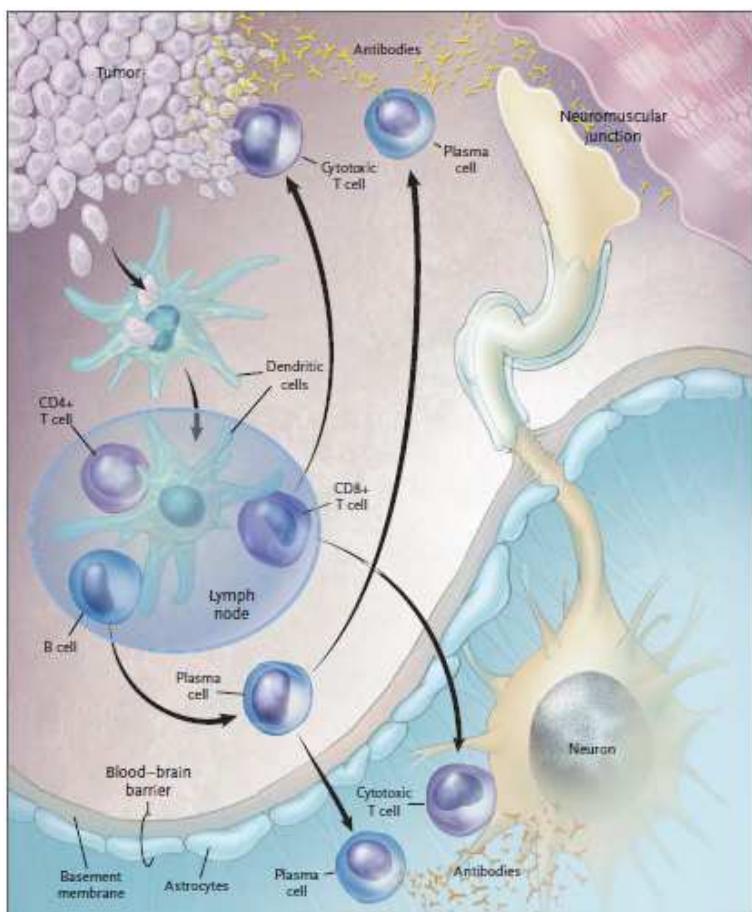
per exemple la fagocitosis o per mediadors inflamatoris secretats per part dels mastòcits). La immunitat cel·lular està especialitzada en eliminar els microorganismes intracel·lulars com virus i bacteris que sobreviuen i proliferen a l'interior de les cèl·lules de l'organisme, en les quals els Acs no hi tenen accés. Perquè els limfòcits T puguin activar-se i ser funcionals, requereixen que prèviament les cèl·lules presentadores d'Ag (APC de l'anglès *Antigen Presenting Cells*) processin els Ags i els hi presentin a les cèl·lules T. La resposta immunitària adaptativa pot dividir-se en diferents fases: la primera és el reconeixement de l'Ag, la segona és l'activació dels limfòcits, i la tercera és la fase efectora mitjançant la qual s'elimina l'Ag, i posteriorment la recuperació de l'homeòstasi i el manteniment de la memòria immunològica.

Per tal de que les APC puguin fer la presentació antigènica és essencial que expressin en la seva superfície molècules de MHC. Les APC més eficaces per iniciar la resposta immune mediada per les cèl·lules T-CD4 són les cèl·lules dendrítiques, que capturen els Ags, els transporten als òrgans limfàtics, i els presenten als limfòcits T-verges per iniciar la resposta immune. Les cèl·lules dendrítiques tenen la capacitat d'expressar MHC de tipus II, i en conseqüència poden presentar els Ags als limfòcits T-CD4. En el cas dels limfòcits T-CD8, perquè s'activin és necessari que els Ags siguin presents per les APC que expressen MHC tipus I, i detectin en el ambient molècules coestimuladores (citosines entre altres) emeses pels limfòcits T-CD4, que induiran la diferenciació dels limfòcits T-CD8.

La presència de l'Ag i de diverses molècules secretades per les APC i altres cèl·lules, induiran l'activació, proliferació i diferenciació dels limfòcits cap a cèl·lules efectores i cèl·lules memòria.

La fase efectora té l'objectiu d'eliminar els Ag. Els limfòcits T-CD4 es diferenciaran a cèl·lules T-CD4 efectores i adquiriran la capacitat de secretar determinades citocines i activar diferents molècules, entre elles els limfòcits B, per tal d'eliminar els Ags. Els limfòcits T-CD8 es diferenciaran, adquiriran la capacitat citolítica, i eliminaran les cèl·lules que via el MHC I expressin l'Ag. Els limfòcits B després d'activar-se es diferenciaran a cèl·lules plasmàtiques i produiran Acs específics d'Ag, que els eliminaran per la via del complement, o els opsonitzaran perquè altres cèl·lules els eliminin (Abbas et al., 2007).

Si ens centrem en les reaccions immunològiques que es donen en les SNP, actualment la hipòtesi més acceptada és que la majoria de SNP tenen un origen immunomediat. Un tumor no involucrat en el SN expressa proteïnes neuronals, que el sistema immune reconeix com a no pròpies. En resposta, les cèl·lules dendrítiques fagociten les cèl·lules tumorals apoptòtiques i migren cap als nòduls limfàtics, on faran una presentació antigènica, i activaran les cèl·lules T-CD4, T-CD8, i cèl·lules B. Les cèl·lules B maduraran a cèl·lules plasmàtiques, i aquestes produiran Acs contra l'Ag tumoral. Els limfòcits B i T (tant CD4 com CD8) frenaran el creixement del tumor, però al mateix temps reaccionaran contra zones del SN, que de forma correcta estan expressant l'Ag. Les cèl·lules B i les T-citotòxiques tenen la capacitat de passar la barrera hematoencefàlica (BHE) i atacar també a les cèl·lules del SNC. L'Ag expressat pel tumor és idèntic al que expressen les cèl·lules neuronals, i per raons desconegudes es trenca la tolerància immunològica a aquest Ag propi que de forma correcta s'està expressant en el teixit nerviós. I al mateix temps, la inflamació facilitaria el pas de clons autorreactius circulants, que re-estimularien la resposta immunològica. En conseqüència es produeix un dany neuronal que es reflexa en els diferents símptomes que mostren els pacients. (**Figura 3**) (Darnell and Posner, 2003). En el cas de les síndromes que afecten al SNC, s'ha detectat un increment d'IgG en el LCR, el que suggereix que hi ha una síntesi intratecal d'aquests Acs.

Figura 3. Mecanisme patogènic de les SNP.

Darnell RB et al. N. Engl J Med, 2003; 349(16):1543-54.

MECANISME

1. Expressió de proteïnes neuronals per part d'un tumor no neuronal
2. Les cèl·lules dendrítiques fagocitaran les cèl·lules tumorals
3. Migració cap als nòduls limfàtics, on activaran les cèl·lules B i T-CD4, T-CD8
4. Les cèl·lules B maduraran a cèl·lules plasmàtiques i produiran anticossos contra antígens tumorals.

Probablement el sistema immunitari frena el creixement del tumor, però per raons desconegudes també ataca al sistema nerviós, que està ~~avivament l'anticiss~~

La raó per la qual l'ELP s'associa a uns tumors i no a uns altres es desconeix. El CPCP i el càncer testicular expressen moltes proteïnes que en el teixit adult estan restringides a les cèl·lules germinals, el que suggereix que el tumor, que expressa proteïnes cerebrals o testiculares, és qui desencadena una resposta autoimmunitària enfront del SN, i de fet els dos càncers més associats a l'ELP són el CPCP i el càncer testicular, i en menys freqüència el de timoma, un altre tumor generalment associat a altres síndromes neurològiques autoimmunes. A més, aquests teixits estan protegits per les barreres endotelials i tenen una expressió mínima, tot i que existent, de molècules APC que expressen MHC I, fet que dóna suport a aquesta hipòtesi autoimmunitària (Darnell and Posner, 2003).

Tot i la bona caracterització dels Acs onconeuronals, no està clar que aquests tinguin un rol patogènic. Per un costat els experiments suggereixen que els Acs són els responsables de la malaltia, primer es donaria la immunoreacció Ag-Ac i això desencadenaria les alteracions neurològiques, però el fet de que els Ags es localitzin a nivell intracel·lular, i no s'hagi pogut reproduir la malaltia en els models animals quan s'administren els Acs (excepte en el cas de l'amfifisina, on sí es reproduceix la síndrome de la persona rígida en el model animal)(Geis et al., 2010), qüestiona el rol patogènic. D'aquesta manera, es creu que podrien formar part de la complexa resposta immune que es dóna, i el dany neuronal estaria mediat sobretot per una resposta cel·lular citotòxica, basada en limfòcits T (Graus et al., 2010). Un fet que dóna suport a aquesta hipòtesi és que en la majoria de les autòpsies de pacients amb SNP del SNC, es detecten infiltrats inflamatoris de cèl·lules mononuclears i cèl·lules TCD4⁺ i TCD8⁺, predominantment en les àrees simptomàtiques i en el tumor (Albert et al., 2000), i tot i que encara no està massa clar el mecanisme exacte pel qual les cèl·lules T desencadenen el dany neuronal (Tanaka et al., 1995), (Dalmau and Rosenfeld, 2008), que les neurones expressin MHC de tipus I i per tant tinguin la capacitat de ser reconegudes per les cèl·lules T donaria suport a aquesta hipòtesi (Corriveau et al., 1998).

4. Anticossos contra antígens de superfície.

Fins als inicis del segle XXI es creia que l'EL era d'etologia autoimmune, associada a càncer i a uns Acs onconeuronals característics. D'aquesta manera, hi havia un grup de pacients amb encefalitis d'etologia vírica, un altre grup de pacients amb encefalitis paraneoplàsica, i un altre grup de pacients idiopàtics (de causa desconeguda) considerats “seronegatius” ja que no se’ls hi havia detectat cap Acs onconeural associat. Fins al moment, les tècniques més utilitzades per detectar la reactivitat Ag-Ac eren la immunohistoquímica i l'immunoblot, i tot i que en el grup de pacients considerats “seronegatius” no se’ls hi havia detectat cap Ac onconeural, les proves

diagnòstiques mostraven la presència de tumors atípics o benignes, tenien alteracions en el LCR, i sorprenentment la majoria de pacients milloraven amb tractaments empírics d'immunosupressors. Això suggeria que aquests pacients presentaven un procés inflamatori o autoimmune, i alguns investigadors es van començar a plantejar la possibilitat de que aquests pacients sí desenvolupaven respostes immunològiques però les tècniques habituals utilitzades en els laboratoris no permetien detectar la causa del procés inflamatori. Els primers passos per comprovar aquesta hipòtesi es van basar en l'ús de tècniques alternatives com el radioimmunoassaig (RIA), i per un altre costat en la modificació de la manera de processar el teixit per la immunohistoquímica (que va permetre visualitzar els Acs que reaccionaven contra el neuròpil de l'hipocamp), l'ús de la immunofluorescència sobre cèl·lules hippocampals活es, i la immunoprecipitació i ànalisi per espectrometria de masses. Diferents estratègies de detecció antigènica que s'explicaran amb detall més endavant.

Amb aquestes noves tècniques i canvis en la manera de processar el teixit van comprovar que alguns dels pacients “seronegatius” (idiopàtics, sense Acs paraneoplàsics clàssics) sí tenien Acs en el sèrum i LCR, però aquests anaven dirigits contra Ags que s'expressaven en la membrana cel·lular de neurones i processos neuronals del neuròpil de l'hipocamp. Aquests Acs no eren detectats mitjançant les tècniques clàssiques com l'immunoblot ja que en la majoria de casos el reconeixement Ag-Ac és conformacional (Ances et al., 2005), (Vitaliani et al., 2005) (Dalmau and Bataller, 2007).

5. Encefalitis i anticossos contra el receptor de NMDA.

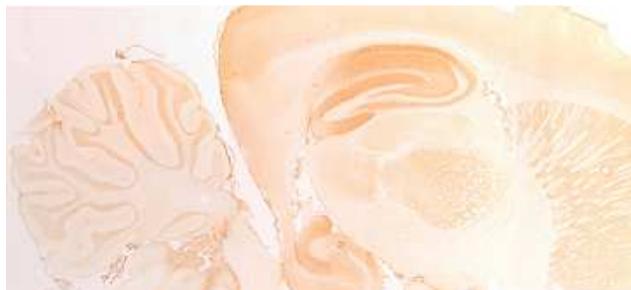
Al 2005 Dalmau i el seu grup van descriure les característiques neurològiques i immunològiques de 4 pacients amb càncer d'ovari i encefalitis que havien desenvolupat alteracions psiquiàtriques importants, convulsions, dèficits de memòria, disminució del nivell de la consciència i hipoventilació. Les quatre eren dones joves, tenien teratoma d'ovari i autoanticossos contra un Ag desconegut que s'expressava preferentment en la membrana de les cèl·lules hipocampals, i cap d'elles tenia Acs contra la proteïna Hu o Ma2, però cridava l'atenció la similitud i la severitat dels símptomes neurològics. Els pacients presentaven inflamació en el LCR, i la clínica va millorar després d'estripar el tumor i administrar immunoteràpia (Vitaliani et al., 2005). Fins al moment, totes les encefalitis s'havien associat a Acs que reaccionaven contra proteïnes intracel·lulars, acompanyades de dany neuronal provocat per les cèl·lules T-citotòxiques, un tumor maligne, i una resposta al tractament poc satisfactòria. Per contra, ara Dalmau describia una síndrome que representava una nova categoria d'encefalitis severa, potencialment mortal, però en la que els pacients responien al tractament.

Dos anys més tard, al 2007 Dalmau i el seu grup van identificar aquell autoantigen causant de la síndrome de les 4 malalties estudiades al 2005. Van ampliar l'estudi a 12 dones de 27 anys de mitjana d'edat (14-44 anys), teratoma d'ovari (una d'elles tenia un quist ovàric), importants alteracions psiquiàtriques, dèficits de memòria i amnèsia, convulsions, discinèsia, disfuncions autonòmiques, i freqüents alteracions en el nivell de la consciència. El sèrum i LCR de totes elles immunoreaccionava intensament contra el neuròpil de l'hipocamp amb un patró característic, i també reaccionava contra la superfície de les neurones hipocampals. De manera que van incubar el sèrum/LCR d'algunes malalties amb les cèl·lules hipocampals, i per immunoprecipitació i espectrometria de masses van identificar l'Ag, que corresponia al receptor de N-metil-D-aspartat (R-NMDA). Després, van comprovar els resultats per tècniques de doble fluorescència sobre el teixit de rata i cèl·lules hipocampals, i el sèrum/LCR de la resta de pacients els van avaluar per cèl·lules HEK transfectades, i van veure que els pacients tenien reactivitat específica contra el NR1, una subunitat del R-NMDA. Posteriorment

van ampliar l'estudi a 100 pacients amb encefalitis i Acs contra el NRI, amb símptomes que incloïen alteracions psiquiàtriques o problemes de memòria, convulsions, disminució del nivell de la consciència, discinèsia, inestabilitat autonòmica, i hipoventilació, i van observar que el 59% tenien un tumor, que principalment era un teratoma d'ovari.

Els investigadors també van fer proves d'immunoblot, i van observar que el sèrum no mostrava reactivitat contra els extractes de proteïnes procedents de cèl·lules hipocampals o cèl·lules HEK transfectades amb les diferents subunitats combinades en forma d'heteròmers, però sí s'observava reacció en incubar-ho amb l'Ac comercial, el que suggeria que els Acs del malalt només reaccionaven amb l'Ag quan estava en condicions normals, és a dir, el reconeixement dels epítops era conformacional (Dalmau et al., 2007), (Dalmau et al., 2008).

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-R-NMDA



Fotografia realitzada per nosaltres

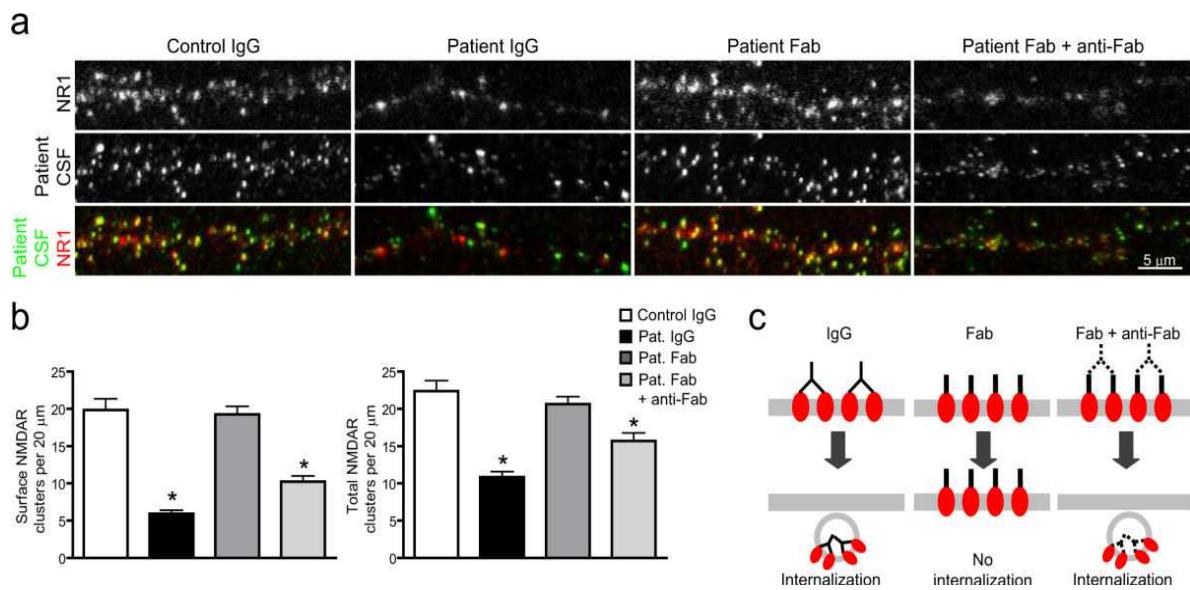
El R-NMDA està format per diferents subunitats: NRI (on s'hi uneix la glicina) i quatre tipus de subunitats NR2 (on s'hi uneix el glutamat: NR2A, B, C, D, amb un 50-70% d'homologia entre elles en el domini extracel·lular). Tant el NRI com el NR2 són essencials per la funcionalitat del receptor, i generalment es troben formant heterotetràmers de dues subunitats de NRI i dues de NR2. La subunitat NRI i NR2A es troben distribuïdes per tot el cervell, NR2B es concentra en l'hipocamp, NR2C en el cerebel, i NR2D es limita a un subgrup de neurones. El R-NMDA intervé en la plasticitat i transmissió sinàptica, expansió de l'arbre dendrític, i en la regulació dels potencials d'acció de llarg termini (*long-term potentiation*) en l'hipocamp, i a més és el principal neurotransmissor excitador. La detecció dels Acs anti-R-NMDA, proporciona

una eina de diagnòstic per les SNP, i suggereix un nou mecanisme immunomediat en el qual els Acs provoquen la disfunció del receptor, i en conseqüència, per les funcions que desenvolupa, els malalts poden tenir esquizofrènia, epilepsia, demència i alteracions en l'aprenentatge i en el comportament. A més, les drogues que actuen sobre aquest receptor provoquen paranoia (Kendrick et al., 1996), (Laube et al., 1997), (Waxman and Lynch, 2005), (Standaert et al., 1994).

Els Acs anti-R-NMDA s'associen a encefalitis o EL d'etologia autoimmune, la majoria són dones joves i el 91% tenen un teratoma d'ovari o quist ovàric i desenvolupen alteracions psiquiàtriques importants, canvis de comportament, pèrdua de memòria, convulsions, moviments anormals (discinèsies), hipoventilació i inestabilitat autonòmica (Dalmau et al., 2007). I els pocs casos detectats en homes, s'associen a teratoma testicular immadur i CPCP. Afortunadament el 70% dels casos es recuperen total o parcialment amb el tractament d'immunoteràpia i extirpació del tumor. L'etologia d'aquesta síndrome és autoimmune, i quan els Acs s'uneixen al receptor provoquen la internalització d'aquests i en conseqüència la disfunció del receptor, provocant psicosis, demència i alteracions en l'aprenentatge i comportament, entre altres.

Un estudi posterior desenvolupat pel grup de Balice-Gordon, va analitzar què passava quan els Acs contra el R-NMDA s'unien a la diana antigènica. Les característiques anatomo-patològiques dels pacients suggerien un rol patogènic dels Acs, ja que quan s'unien al receptor (autoantigen), s'alterava la funció d'aquests i inclús deixaven de ser funcionals. Per comprovar aquesta hipòtesi es va posar en contacte durant 24 hores el LCR o les IgG purificades procedents del sèrum/LCR de malalts amb Acs anti-NRI, amb cèl·lules hippocampals活的s. Posteriorment es va fer una immunohistoquímica i un immunoblot, i van analitzar la quantitat de proteïna que hi havia en total, i a la superfície, i van observar que els Acs dels malalts feien disminuir considerablement la quantitat de R-NMDA que hi havia a la superfície cel·lular. Quan deixaven incubant el sèrum dels malalts amb les cèl·lules hippocampals活的s durant 3 o 7 dies obtenien els mateixos resultats. Per tal de determinar com es correlacionava la clínica dels malalts amb els Acs, van extreure el LCR dels malalts en dos situacions, la primera en el moment de la presentació clínica on els símptomes neurològics cada cop s'agreujaven, i la segona després del tractament, quan el pacient es recuperava i la simptomatologia

clínica disminuïa, i van observar que la mostra obtinguda a l'inici de la malaltia, tenia més quantitat d'Acs que la que havien obtingut quan el pacient es recuperava, i en ambdós casos els Acs havien provocat la disminució de la quantitat de receptors a la membrana. Aquests Acs eren específics dels R-NMDA i no alteraven la resta de receptors de la membrana (AMPA, etc), és a dir, es conservava la integritat estructural de la membrana i la resta de receptors relacionats amb l'excitació neuronal i sinapsis. També van observar que quan retiraven els Acs del medi on estaven, es recuperava el nombre normal de R-NMDA, el que significava que era un procés reversible, i al mateix temps evidenciava que els Acs tenien un efecte sobre els receptors, sense afectar a la supervivència de la cèl·lula. Paral·lelament van comprovar que l'efecte dels Acs dels pacients no estava mediat per complement, ja que havien incubat el sèrum/LCR dels malalts inactivat per calor, i les IgG purificades, i en ambdós casos els efectes eren similars. Per tal de determinar què passava amb els receptors, i conèixer el mecanisme pel qual els Acs feien disminuir els R-NMDA a la membrana, enzimàticament van separar la part constant (Fc) de la part variable (Fab) dels Acs, i van posar en contacte durant 24 h les cèl·lules hipocampals活es amb les IgG del pacient, amb la part Fab, i amb els fragments divalents de la part Fab, i van observar que quan posaven els fragments Fab sols no es donava la internalització del receptor, per contra quan incubaven les cèl·lules amb les IgG o amb els fragments divalents Fab sí es donava la internalització dels R-NMDA, disminuint així la quantitat de receptor que quedava en la membrana (**Figura 4, imatge C**) (Hughes et al., 2010).

Figura 4. Endocitosi dels receptors de NMDA, induït pels anticossos dels pacients.

Hughes et al. J.Neurosci, 2010; 30(17):5866-75.

En la figura 5a i 5b de l'article de Hughes, es veu reflectit el mecanisme de la internalització dels receptors, per causa directa dels anticossos.

6. Descripció d'altres anticossos contra antígens de membrana associats a encefalitis.

Amb el descobriment dels Acs contra el R-NMDA sorgeix un nou grup d'encefalitis no clàssiques associades a Acs de membrana que es podien donar amb o sense càncer associat, responen satisfactoriament als tractaments amb immunoteràpia, i la disfunció neurològica podia ser local o multifocal. Inicialment, se'ls va denominar “Acs antineuròpil de l'hipocamp” degut al potencial clínic i la limitació de no conèixer la naturalesa exacta d'aquests nous Acs, però segons un estudi retrospectiu de 4 anys avaluant 39 pacients amb diferents SNP, el 44% dels pacients presentaven Acs contra el neuròpil de l'hipocamp, el 49% tenien Acs contra Ags prèviament coneguts (Hu, Ma2, etc.), i en tan sols 3 pacients no se'ls hi havia detectat cap Ac. D'aquest estudi es va

concloure que: 1) el 82% dels pacients amb EL no vírica tenien Acs contra proteïnes del SN, 2) els pacients amb Acs contra el neuròpil de l'hipocamp constituïen un grup heterogeni, i 3) la presència d'aquests Acs s'associava a una resposta favorable al tractament amb immunosupressors. Una altra diferència respecte les SNP clàssiques era que en aquest cas, les autòpsies no mostraven infiltrats de cèl·lules T a nivell intersticial ni perivascular, però mostraven depòsits d'IgG en l'hipocamp i l'amígdala, i una notable proliferació de microglia, degeneració neuronal variable i rarament infiltrats inflamatoris (Moscato et al., 2010), (Dalmau et al., 2007).

Els Ags de membrana són receptors i proteïnes sinàptiques com el R-NMDA, el receptor AMPA, el receptor GABA_B, etc. que es localitzen en les sinapsis neuronals o superfície cel·lular. Estan funcionalment relacionats entre ells, i implicats en la plasticitat i transmissió sinàptica, de manera que intervenen en processos de memòria, comportament, aprenentatge i cognició. Quan els Acs s'hi uneixen, s'altera la seva funció o estructura, i en conseqüència es desencadenen les diferents disfuncions neurològiques i símptomes característics d'aquests pacients, com són les convulsions i alteracions psiquiàtriques, dèficits de memòria, canvis en el comportament, cognició, o inclús psicosi. Generalment s'associen a encefalitis, i tot i que la simptomatologia és similar en totes elles, cada Ac acostuma a caracteritzar-se majoritàriament per unes característiques clíniques, per exemple, l'encefalitis amb Acs anti-R-NMDA s'associa a alteracions psiquiàtriques, mentre que en les encefalitis amb Acs anti-receptor GABA_B les alteracions psiquiàtriques acostumen a anar acompanyades de convulsions. I el tipus de tumor associat també és diferent.

Després del descobriment dels Acs que reaccionen contra el R-NMDA, aplicant les mateixes tècniques (a excepció de la identificació dels Acs contra els canals de potassi) s'han anat descobrint més Acs que reaccionen contra autoantígens de membrana associats a determinades SNP, en especial associades a l'EL.

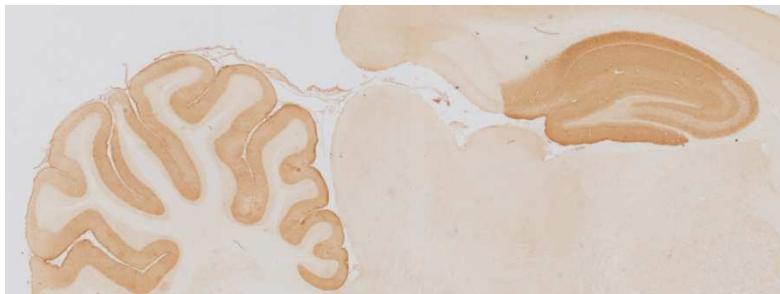
6.1 Anticossos contra el receptor AMPA.

Dalmau i el seu grup al 2009 van detectar i identificar, per la tècnica d'immunoprecipitació i espectrometria de masses, uns Acs que reaccionaven contra el receptor de l'àcid alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propònic (R-AMPA) en malalts amb EL. Van realitzar un estudi amb 10 pacients amb EL, 9 d'ells eren dones, i 7 tenien càncer de pulmó, mama o timus, i van detectar Acs contra el R-AMPA en tots ells. També van realitzar experiments funcionals incubant el LCR dels pacients durant 11-17 dies amb cèl·lules hipocampals, i cada 3 dies treien el medi de les cèl·lules i en posaven de nou, i van observar que després de 6 dies, el nombre de R-AMPA que hi havia a la membrana disminuïa, igual com havia passat en els experiments anteriors amb els R-NMDA en posar-los en contacte amb els Acs anti-NMDA, el que suggeria que en aquest cas, els Acs anti-R-AMPA també podien ser patogènics, i per tant desencadenar les alteracions neurològiques d'aquests pacients. I per microscopia confocal van demostrar que el R-AMPA es localitzava al llarg de les dendrites. 9 pacients van respondre al tractament però amb recaigudes, i 1 pacient no va ser tractat i va morir (Lai et al., 2009).

EL R-AMPA és un receptor de glutamat ionotrópic, format per quatre subunitats (GluR1, 2, 3, 4), que es combinen entre elles en forma d'heterotetràmers, i tot i que les diferents subunitats tenen certa homologia, la diana antigènica són el GluR1 i GluR2. En l'estudi realitzat pel grup de Dalmau, 6 pacients reaccionaven contra la subunitat GluR2, i 3 pacients contra la GluR1. El R-AMPA es localitza a les sinapsis del cervell, tot i que l'heterotetràmer GluR1/2 es concentra en l'àrea CA3-CA1 de l'hipocamp, sistema límbic, subiculum, cerebel, caudat i putamen, i córtex cerebel·lar. I l'heterotetràmer GluR2/3 es troba altament concentrat a l'hipocamp i sistema límbic. A diferència dels pacients amb encefalitis de Rasmussen, en aquest cas no s'ha observat cap reactivitat contra el GluR3 (Rogers et al., 1994). A nivell funcional, el R-AMPA intervé en la majoria de les sinapsis excitadores, i està implicat en els mecanismes de memòria, aprenentatge i convulsions (Sheperd and Huganir 2007), (Palmer et al., 2005). Els Acs anti-R-AMPA s'associen a l'EL generalment paraneoplàsica, i responen al tractament però tenen recaigudes. Tres pacients a més tenien altres Acs, un tenia Acs

contra el GAD (descarboxilasa de l'àcid glutàmic), l'altre anti-CV2 i l'altre anti-SOX i anti-VGKC.

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-R-AMPA.



Fotografia realitzada per nosaltres

6.2 Anticossos contra el receptor GABA_B.

Al 2010 Dalmau i els seus col·laboradors van detectar i identificar, per la tècnica d'immunoprecipitació i espectrometria de masses, Acs contra el receptor de l'àcid gamma-aminobutíric (GABA_B) en malats amb EL. Van realitzar un estudi amb malalts sospitosos de tenir ELP o idiopàtica, i reactivitat contra el neuròpil de l'hipocamp, i van detectar Acs contra aquest receptor en 15 pacients. Tots ells tenien convulsions, confusió i problemes de memòria, i 8 eren homes. Dels 15, 5 tenien CPCP o de pulmó, i algun quist ovàric benigne o adenopatia mediastínica, i alguns d'ells tenien a més altres Acs onconeuronals (2 GAD, 1 SOX, 3 anti-tirosina, 3 Acs contra canals de Calci). 9 pacients van respondre al tractament satisfactoriament (Lancaster et al., 2010).

El R-GABA_B és un receptor transmembrana metabotròpic format per dues subunitats: B1 i B2, però la diana antigènica dels Acs és la subunitat B1. Intervé en la transmissió sinàptica i inhibició dels neurotransmissors excitadors a nivell post-sinàptic, i modula els canals de calci i potassi per obtenir un equilibri en el potencial de la neurona

(estimula l'obertura dels canals de potassi, i evita que s'obrin els de calci). L'alteració d'aquest receptor desencadena convulsions i déficits de memòria, i l'experimentació amb animals demostra que la falta de R-GABA_B comporta la pèrdua del control de les neurotransmissions, tant de les excitadores com de les inhibidores (Moscato et al., 2010), (Schuler et al., 2001).

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-R-GABA_B



Fotografia realitzada per nosaltres

6.3 Anticossos contra el receptor metabotròpic mGluR5.

Al 1982 Ian Carr va descriure el cas de la seva filla, una nena de 15 anys amb progressiva pèrdua de memòria, anomalies en les converses, depressió, al·lucinacions, alteracions en el comportament, i limfoma de Hodgkin. Va respondre al tractament satisfactoriament, i Carr va postular que es tractava d'un mecanisme immunomediat. I suggeria la possibilitat de que la presència "d'Acs circulants" dirigits contra un Ag expressat pel SN i també pel tumor fos la causa de la síndrome, i la va anomenar "Síndrome d'Ophelia" (Carr, 1982). Uns anys més tard, al 2011 el grup de Dalmau van immunoprecipitar el sèrum de dos pacients amb una clínica similar a la d'Ophelia, i van detectar i identificar la presència d'Acs contra el receptor metabotròpic de glutamat 5 (mGluR5). Els dos pacients tenien encefalopatia límbica i limfoma de Hodgkin (Lancaster et al., 2011b).

Els receptors metabotòpics de glutamat són una família de 8 receptors. Es distribueixen en tres grups: grup I (mGluR1 i mGluR5), grup II (mGluR2 i mGluR3) i grup III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, i mGluR8), i tots ells tenen la funció de modular l'activitat neuronal, activant la senyalització intracel·lular per la via d'unió a les proteïnes G. Els receptors metabotòpics mGluR1 i mGluR5 comparteixen el 85% de la seqüència d'aminoàcids, i segons el patró immunohistoquímic, aquests autoantígens es distribueixen per tot el cervell. Tot i que el mGluR5 s'expressa més intensament en les regions telencefàliques, incloses el córtex cerebral, l'hipocamp (localitzat especialment en les dendrites de les cèl·lules piramidals i cèl·lules granulars), subiculum, nucli del bulb olfactori, estriat i nucli acumbens. I el mGluR1 s'expressa principalment en l'hipocamp i cerebel, en la regió perisinàptica de les espines dendrítiques de les cèl·lules de Purkinje del córtex cerebral i bulb olfactori. El mGluR5 actua modulant les funcions sinàptiques i induint la *long-term depression* (Nicoletti et al., 2011) especialment sobre l'hipocamp, i també intervé en la regulació de la proliferació, diferenciació i autorenovació de les cèl·lules mare, i s'ha vist que les alteracions genètiques en aquest gen comporten déficits en l'aprenentatge. El mGluR1 en canvi és necessari per la senyalització dendrítica en les cèl·lules que expressen aquest receptor, especialment en les sinapsis excitadores, i la correcta activació del mGluR1 és imprescindible per l'aprenentatge motor i la coordinació (Choi et al., 2011), (Gultekin et al., 2000).

La presència d'Acs anti-mGluR5 s'associa a l'encefalitis i limfoma de Hodgkin, mentre que els Acs anti-mGluR1 s'associen a la degeneració cerebel·losa paraneoplàsica amb limfoma de Hodgkin o idiopàtic.

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-mGluR5



Modificació de la figura extreta de: Lancaster et al., Neurology, 2011; 77(18):1698-701

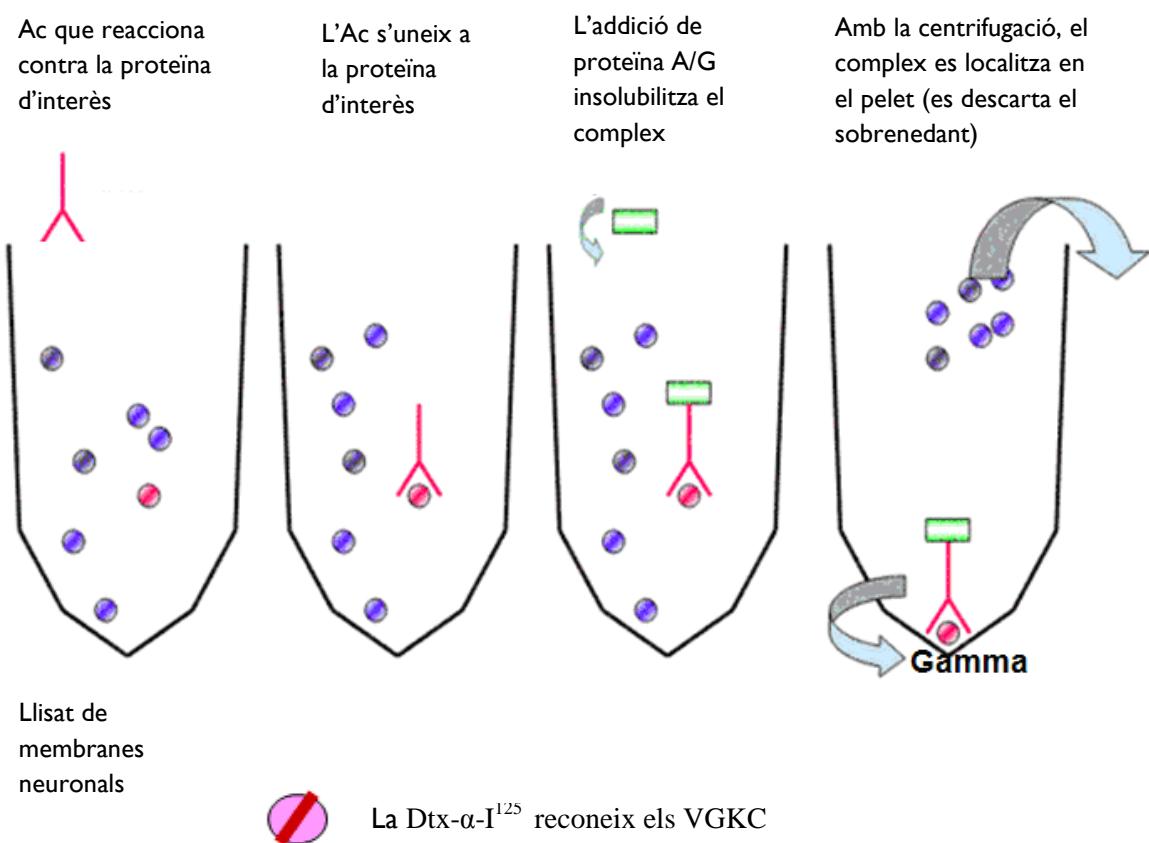
6.4 Anticossos contra el complex proteic dels canals de potassi (LGII i Caspr2).

Els Acs contra els canals de potassi (VGKC) es van identificar per RIA (un mètode d'immunoprecipitació indirecta, que més endavant s'explicarà amb detall), i s'havien relacionat amb síndromes com la síndrome d'Iсаac (caracteritzada per una hiperexcitabilitat neuromuscular i elevada freqüència de descarregues neuromiotòniques). Però al 2001 Buckley i els seus col·laboradors van descriure el cas de dos pacients amb EL i Acs contra els VGKC (Buckley et al., 2001), i al 2004 Thieben i el seu grup van descriure la clínica de 7 pacients amb encefalopaties autoimmunes que també presentaven Acs contra els VGKC (Thieben et al., 2004). I van concloure que aquests Acs eren un bon marcador de les encefalopaties autoimmunes, en les quals els pacients acostumaven a respondre al tractament satisfactòriament, i les manifestacions neurològiques dels malts amb diferents encefalopaties autoimmunes eren similars i no es podien diferenciar de l'ELP, però sí dels casos amb síndrome de Morvan i encefalopatia de Hashimoto. En ambdós estudis, els VGKC es van identificar per RIA, però quan el grup de Dalmau va intentar detectar aquests Acs en el sèrum de 57 pacients amb “EL i Acs anti-VGKC” pel mètode d'immunofluorescència sobre cèl·lules HEK transfectades amb VGKC, els resultats van ser negatius (Lai et al., 2010).

La tècnica RIA es basa en la immunoprecipitació indirecta utilitzant un marcatge radioactiu, generalment la dendrotoxina α -I¹²⁵. Els Acs del pacient s'uneixen a l'Ag present en el llistat de membranes neuronals, prèviament marcades amb la dendrotoxina α -I¹²⁵, i s'insolubilitza afegint proteïna A/G (**Figura 5**). La desavantatge d'aquesta tècnica és que s'immunoprecipita tot el complex proteic.

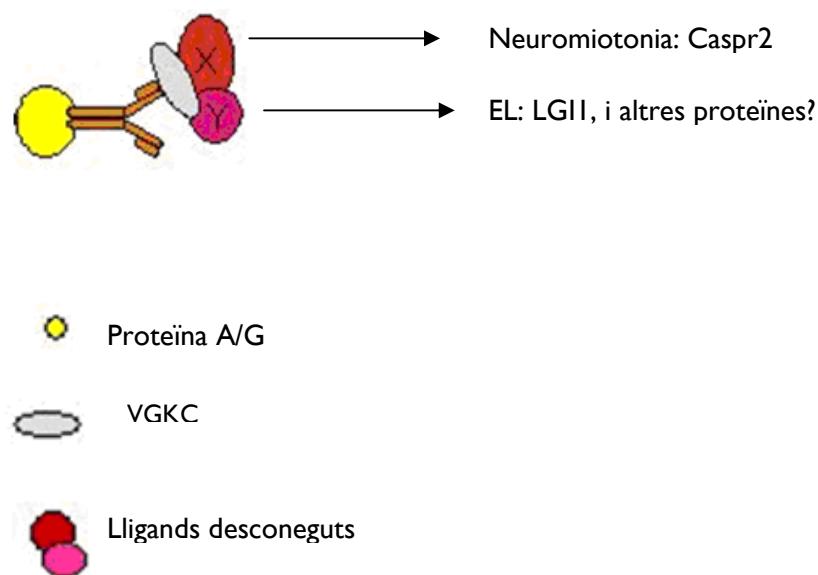
Figura 5. Esquema representatiu de les desavantatges de la immunoprecipitació indirecta.

Els VGKC eren l'Ag real de les EL?



Dalmau suggeria que els Acs d'aquests pacients amb EL reconeixien una proteïna de membrana que no eren els VGKC, sinó una altra proteïna associada a aquest macrocomplex proteic. A diferència del R-NMDA, R-AMPA i R-GABA_B, que s'havien identificat per immunoprecipitació i espectrometria de masses, i posteriorment s'havien comprovat els resultats per immunoblot amb un Ac comercial dirigit contra la molècula identificada, o per immunofluorescència sobre cèl·lules HEK transfectades, en el cas dels VGKC s'havien identificat per una tècnica indirecta, i no s'havien comprovat els resultats per altres tècniques alternatives. Possiblement entre les proteïnes immunoprecipitades estava la molècula d'interès, però també hi havia altres proteïnes accessòries, i erròniament es va atribuir l'antigenicitat als VGKC (**Figura 6**). Com bé suggeria Dalmau, els pacients amb EL reaccionaven contra una altra proteïna de membrana, el LGII, i també van veure que un nombre reduït de pacients amb encefalitis, reaccionaven contra la molècula Caspr2 (Lai et al., 2010).

Figura 6. Esquema representatiu de la co-immunoprecipitació.



LGII

El grup de Dalmau van estudiar el sèrum de 57 pacients amb encefalitis i Acs atribuïts prèviament als VGKC per la tècnica d'immunohistoquímica, immunoprecipitació i espectrometria de masses, i posteriorment immunocitoquímica sobre cèl·lules HEK transfectades. I per confirmar la identitat de l'autoantigen van realitzar tècniques d'immunoabsorció i immunohistoquímica sobre teixit de ratolí deficient en LGII (de l'anglès *Leucine-rich glioma inactivated*). Amb els diferents experiments Dalmau va demostrar que l'autoantigen específic d'alguns malalts amb encefalitis no eren els VGKC, sinó el LGII (Lai et al., 2010).

El LGII és una proteïna d'uns 63KDa, es troba uniformement distribuïda per la superfície cel·lular (en forma de proteïna ancorada a la membrana) i pel citoplasma (en la forma secretada), interactuant amb la proteïna pre-sinàptica ADAM23 i la post-sinàptica ADAM22, però els Acs dels pacients reaccionen només contra LGII, tant si està sol com si està unit a les proteïnes ADAM. LGII és un supressor de la metàstasi, la seva funció està relacionada amb el control de la invasió tumoral, i també està implicat en l'organització de les proteïnes trans-sinàptiques, incloses la subunitat Kv1.1 dels VGKC (pre-sinàptics) i el R-AMPA (post-sinàptic). A més, s'ha observat que la mutació en aquest gen causa epilepsia parcial i al·lucinacions visuals o auditives (Sagane et al., 2008), (Fukata et al., 2010).

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-LGI1



Fotografia realitzada per nosaltres

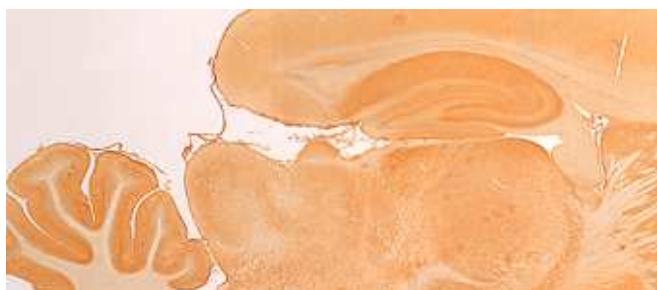
CASPR2

Recentment el grup de Dalmau havia descrit que el LGII era el principal autoantigen associat a l'EL, prèviament atribuït als VGKC, i en el mateix estudi demostraven que quedava un grup de pacients, amb EL o altres síndromes, que tenien reactivitat contra un Ag encara desconeugut. Per la tècnica d'immunoprecipitació i espectrometria de masses, Dalmau i el seu grup van demostrar que un grup concret de pacients tenien Acs contra la molècula Caspr2 (*contactin-associated protein like-2*), i tot i que en aquest cas la clínica no es va examinar extensament, la reactivitat dels Acs es detectava en el cervell, i també a nivell perifèric (Lancaster et al., 2011a).

Caspr2 és una proteïna de la família de les neurexines. Es troba en el cervell i nervis perifèrics, localitzada en la regió juxtaparanodal dels axons mielinitzats, colocalitzant amb les subunitats Kv1.1, Kv1.2 dels VGKC, i ADAM22. La patogenicitat d'aquests Acs i el motiu pel qual causen una disfunció en el SNC i SN perifèric encara no es coneix, però la mutació d'aquesta proteïna s'associa a esquizofrènia, psicosis, convulsions focals, autisme, retard mental, i displàsia (Lancaster et al., 2011a), (Poliak et al., 1999).

Els Acs anti-Caspr2 s'associen a alteracions en el SNC (encefalitis), SN perifèric (neuromiòtonia perifèrica), o en ambdós (Síndrome de Morvan). La clínica d'aquests pacients inclou alteracions cognitives, pèrdua de memòria, al·lucinacions, deliris, convulsions, neuromiòtonia perifèrica, i neuropatia sensitiva i motora. Els pacients acostumen a tenir un tumor, el més freqüent és el timoma, i generalment milloren amb el tractament (Lancaster et al., 2011a), (Irani et al., 2010).

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-Caspr2



Fotografia realitzada per nosaltres

D'aquesta manera s'ha anat veient que cada Ac de membrana s'associa preferentment a unes determinades síndromes, i a un determinat tipus de càncer (**Taula 4**).

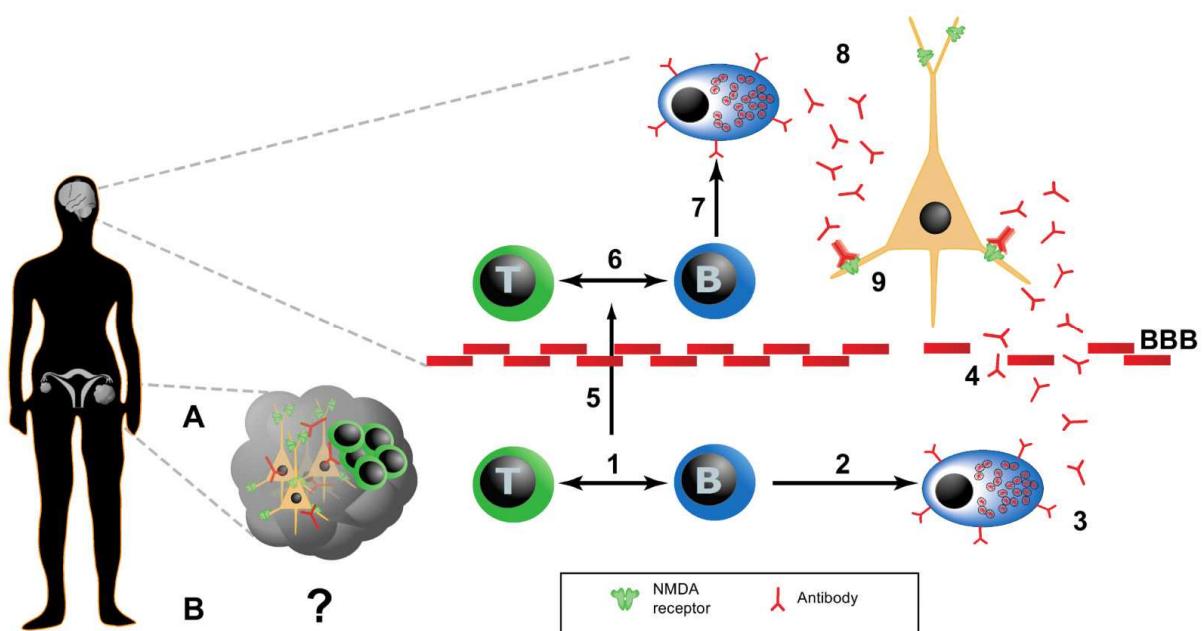
Taula 4. Anticossos contra antígens de membrana.

Anticòs	Síndrome neurològica	Càncer associat	% càncer
R-NMDA	Encefalitis, alteracions psiquiàtriques	Teratoma d'ovari	30
R-AMPA	Encefalitis límbica amb recaigudes	CPCP, mama, timoma	60
R-GABA _B	Encefalitis límbica amb convulsions	CPCP	70
LGII	Encefalitis límbica	No	0
CASPR2	Encefalitis, Morvan, hiperexcitabilitat	Timoma	30
mGLUR5	Encefalitis límbica	Limfoma de Hodgkin	100%?

7. Mecanisme patogènic dels anticossos de membrana.

Fins al moment, totes les encefalitis s'havien associat a Acs que reaccionaven contra proteïnes intracel·lulars, en les que el mecanisme patogènic s'associa preferentment a les cèl·lules T, i els Acs només contribuirien al desenvolupament de la resposta immune, de manera que no es creu que tinguin una acció directa perquè no tenen accés a l'Ag. Però amb aquest nou grup de SNP associades a Ags de membrana, la hipòtesi del rol patogènic varia una mica. Balice-Gordon i el seu grup, estudiant el R-NMDA van desenvolupar una hipòtesi sobre el mecanisme patogènic de l'encefalitis associada als Acs anti-R-NMDA, que per la similitud que hi ha entre els Acs associats a Ags de membrana, possiblement aquesta hipòtesi també sigui vàlida per la resta de reactivitats.

En el grup de malalts amb encefalitis i Acs contra el R-NMDA (**Figura 6**) es creu que la resposta s'inicia per **(A)** la detecció d'Ags neuronals expressats en el teratoma d'ovari o altres tumors, o **(B)** per raons desconegudes. L'expressió ectòpica dels receptors per part del tumor, o altres mecanismes (com el mimetisme molecular), trencaria la tolerància immunològica i provocaria l'activació del sistema immune, que desencadenaria l'activació de les cèl·lules dendrítiques i cèl·lules T per poder fer la presentació antigènica i generar cèl·lules B memòria **(I)** entre altres. Les cèl·lules B maduraran a cèl·lules plasmàtiques i sintetitzaran Acs específics d'Ag **(2)**, que reconeixeran l'Ag expressat en el tumor **(3)**, i en el SNC **(4)**. Per causes desconegudes la BHE està alterada i és més permeable, i això es produeix en estadis inicials de la malaltia. A més, les cèl·lules B memòria i cèl·lules T activades travessarien la BHE quan es troba en condicions normals **(5)**, de manera que aquestes cèl·lules entrarien i reestimularien el sistema immune **(6)** provocant l'expansió clonal i diferenciació de les cèl·lules B memòria a cèl·lules plasmàtiques dins el SNC **(7)**, que produiran més Acs a nivell intratecal **(8)**. Els Acs procedents de fora la BHE **(4)** i els de síntesi intratecal **(8)** provocarien la internalització del receptor antigènic, causant la disfunció d'aquest **(9)** (Moscato et al., 2010).

Figura 6. Mecanisme patogènic dels anticossos contra el receptor NMDA.

Moscato E.H et al. Eur J Neurosci, 2010; 32(2):298-309

Un fet que dóna suport a aquesta hipòtesi és que en moltes SNP el LCR dels malats mostra pleocitosis limfocitària i síntesi intratecal d'Acs, el que suggereix que després de l'activació inicial de la resposta immune, hi ha una expansió d'aquesta resposta dins el SN (Dalmau and Rosenfeld, 2008).

El rol patogènic dels Acs s'ha establert per diverses raons:

- 1) Els Acs tenen accés directe a l'Ag.
- 2) Els Acs provoquen la internalització dels receptors, alterant la seva estructura i/o funció, en l'anàlisi *in-vitro*.
- 3) Quan la clínica del pacient millora, hi ha una disminució de la quantitat d'Acs en el sèrum i LCR, i una disminució de les alteracions sinàptiques i cel·lulars.

8. Esclerosi múltiple i anticossos contra la contactina-2.

8.1 Concepte d'Esclerosi múltiple.

L'esclerosi múltiple (EM) es troba entre les malalties neurològiques més freqüents i importants pel que fa a la seva freqüència, cronicitat i tendència a atacar a joves i adults. És una malaltia inflamatòria del SNC que té una clínica i una patologia heterogènia, clínicament es caracteritza per una afectació, d'extensió variable, dels nervis òptics, tronc cerebral i medul·la espinal, que apareix i remet durant un període de molts anys. Les manifestacions neurològiques són nombroses i estan associades a la localització i extensió dels focus de desmielinització, dependent de les àrees danyades poden tenir afectació a la vista, a la sensibilitat, a la coordinació del moviment, etc. tot i que les lesions tenen predilecció per certes parts del SNC. Però és difícil de diagnosticar en estadis inicials ja que els símptomes no són sempre molt evidents, i en molts casos apareixen i desapareixen durant mesos, però la desmielinització es continua produint, de manera que la malaltia avança (Ropper et al., 2007).

L'aparença histològica de la lesió depèn de la seva edat. Les lesions relativament recents mostren destrucció parcial o complerta i pèrdua de mielina per tota la zona, està formada per l'acumulació de molts petits focus, i s'observa degeneració lleugera d'oligodendroglia, reacció neuroglial (astrocítica) i infiltració perivascular de cèl·lules mononuclears i limfòcits, i més tard els macròfags infiltren les lesions. Per un altre costat les lesions de llarga durada es componen de teixit fibrogial, i fins a cert punt acel·lular, amb només limfòcits i macròfags perivasculars ocasionals. Degut a que és una malaltia heterogènia, molts estudis sobre la patogenicitat s'han centrat en estudiar les lesions desmielinitzants de la substància blanca en la fase crònica de la malaltia, i recentment la societat nacional americana d'EM va desenvolupar un projecte amb l'objectiu de catalogar els diferents tipus de lesions, i desenvolupar un model més precís. El tipus de lesions s'han classificat en 4 patrons:

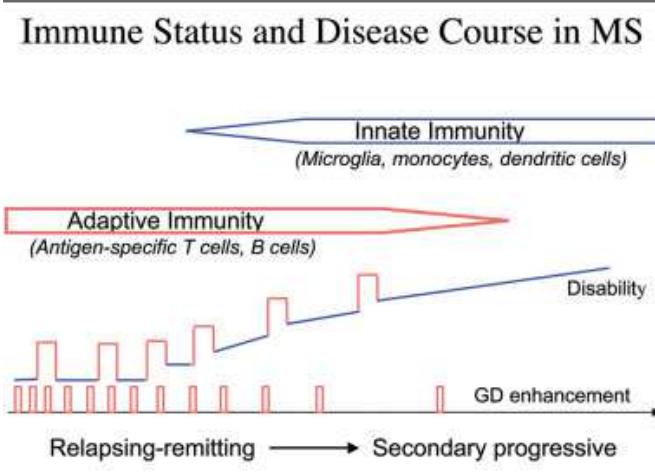
- **Patró I.** En la lesió hi ha plaques amb infiltrats inflamatoris, predominantment de cèl·lules T i macròfags, al voltant dels vasos i capil·lars. Els oligodendròcits estan relativament intactes i no hi ha signes d'activació d'Acs.
- **Patró II.** En la lesió predominen els infiltrats inflamatoris amb cèl·lules T i B, i hi ha depòsits d'Acs amb complement activat.
- **Patró III.** Les lesions són difuses i presenten inflamació. Es caracteritza per una apoptosi d'oligodendròcits, mielina vesiculitzada i pèrdua de MOG (glucoproteïna mielínica oligodendrocítica, de l'anglès *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), una proteïna que constitueix la mielina. Les lesions no envolten els vasos ni capil·lars, i hi ha un anell de mielina intacte al seu voltant.
- **Patró IV.** La lesió es presenta amb marges irregulars. Es caracteritza per la mort no apoptòtica d'oligodendròcits, i no s'observa inflamació ni dany de la mielina. No hi ha oligodendròcits en el centre de la lesió i no està activat el complement, ni hi ha pèrdua de MOG.

Els dos primers patrons es consideren atacs autoimmunes contra la mielina, mentre que els dos últims són contra els oligodendròcits. Alguns dels experts no estan massa d'acord amb aquesta classificació ja que posen en dubte la significació que té, creuen que les lesions poden passar d'un tipus a un altre amb el temps, altres experts creuen que malgrat no sigui una classificació perfecta i encara queda molt per descobrir sobre aquesta malaltia ajuda a agrupar els malalts, per poder conèixer millor les diferents evolucions de l'EM (Hu and Lucchinetti, 2009).

La causa de la malaltia continua sense identificar-se, es coneix que hi ha una susceptibilitat a determinats factors genètics i ambientals, i tot suggereix que és d'etologia autoimmune. Alguns experts creuen que un contacte amb determinades infeccions virals durant la infantesa desencadenaria un mimetisme molecular, que anys més tard, per causa desconeguda conduirien a que es trenqués la tolerància. El sistema immunològic atacaria la mielina dels axons, produint dany o inclús destrucció dels nervis, i això provocaria les alteracions en la comunicació neuronal.

Es creu que l'estratègia immunològica varia segons l'evolució de la malaltia. La fase remitent recurrent es caracteritza per brots clínics i alteracions que s'aprecien amb la ressonància magnètica i una mínima incapacitat, manifestacions que estarien desencadenades per una resposta immune adaptativa. Per contra, la fase secundària progressiva, es caracteritza per absència de brots clínics i estaria desencadenada per una resposta immunològica innata (**Figura 7**) (Weiner, 2009).

Figura 7. Sistema immune i curs de l'esclerosi múltiple.



Weiner H.L. et al. Ann Neurol. 2009; 65(3):239-48.

8.2 Mecanisme patogènic de l'esclerosi múltiple.

La inflamació del SNC causa el dany, i la patologia de l'EM es defineix com un procés inflamatori associat a la formació de plaques focals de desmielinització de la substància blanca del cervell i medul·la espinal. Els factors concrets que desencadenen la inflamació i la resposta autoimmuna es desconeixen, a nivell ambiental la predisposició s'associa al mimetisme molecular d'alguna infecció anterior, però tot i que els virus podrien desencadenar les recaigudes, finalment no s'ha demostrat que per sí sols desencadenin l'EM. Tot i així, alguns estudis suggereixen que infeccions que afecten al

SNC durant la infantesa o l'adolescència, com el virus de l'*Epstein-Barr*, podrien tenir un rol important (Weiner, 2009).

Per un altre costat l'EM es diagnostica preferentment en caucàsics respecte altres grups ètnics, fet que dóna suport a la hipòtesi de la implicació genètica, a més estudis recents han identificat alguns gens associats a aquesta susceptibilitat (Hafler et al., 2007), tot i que aquests no s'hereten segons un patró simple de transmissió mendeliana, sinó que la susceptibilitat global ve determinada per interaccions complexes de variants al·leliques d'un gran nombre de gens, que de forma individual només contribueixen al risc global de la malaltia. Els estudis epidemiològics indiquen una etiologia multifocal, però el principal gen (30% de susceptibilitat) s'associa al MHC, codificat en el cromosoma 6, concretament als gens de l'HLA-D, una molècula involucrada en el reconeixement i presentació d'Ags al sistema immune, seguit del gen que codifica per la cadena alfa del receptor de la interleucina 2 (IL-2), i amb menys rellevància també hi ha susceptibilitat associada als gens que codifiquen per la IL-7, i a altres gens que codifiquen per molècules coestimuladores, receptors, kinases, i proteïnes reguladores entre altres.

Molts immunòlegs creuen que l'EM és una malaltia desencadenada per l'acció de les cèl·lules T. La idea es recolza en l'evidència de que aquest tipus de cèl·lula inicia les lesions en l'encefalomieltitis autoimmune experimental (EAE, un dels models animals de l'EM). Però tot i que l'entrada de les cèl·lules T-autoreactives en el SNC desencadena una reacció inflamatòria perivascular, la relació amb la desmielinització, una característica principal de l'EM, no està clara. Per contra, és possible que l'estimulació intensa de les cèl·lules T sigui per sí mateixa suficient per induir la desmielinització, tot i que altres investigadors creuen que es requereix una agressió o estimulació addicional (Lassmann et al., 2007).

La funció dels factors humorals i cel·lulars en la producció de les plaques focals desmielinitzants encara no es coneix completament, però la participació del sistema immunològic és evident per la presència de proteïnes immunològiques oligoclonals en el LCR de la majoria dels malalts. Els Acs que es troben en el sèrum dels pacients amb EM (i alguns individus sans) tenen la capacitat de lesionar la mielina, inhibir la

remielinització i bloquejar la conducció axoniana quan s'afegeixen als cultius procedents de teixit nerviós de ratolins nounats, en presència de complement.

Pel que fa als factors cel·lulars es creu que tenen un rol patogènic, sobretot per part dels limfòcits T, que regulen les reaccions immunològiques, ja sigui potenciant-les (cèl·lules T auxiliars) o inhibint-les (cèl·lules T supressores). Les cèl·lules auxiliars (T-CD4) es troben en abundància dins de les plaques d'EM i al voltant de les vènules, i està demostrat que els receptors de les cèl·lules T responen als Ags presentats per les molècules que expressen MHC classe II (macròfags i astròcits). Es creu que aquesta interacció estimula la proliferació de cèl·lules T i activa una cascada d'esdeveniments cel·lulars relacionats, que inclouen l'activació de cèl·lules B i macròfags, i la secreció de citocines com l'interferó. Aquests mecanismes cel·lulars s'acompanyen de la desintegració de la BHE, i en casos molt intensos també es dóna destrucció d'oligodendròcits i mielina. Aquestes dades donen suport a la hipòtesi de la reacció inflamatòria autoimmune mediada per cèl·lules T, almenys com a mecanisme per mantenir la inflamació. Al principi es creia que les recaigudes clíniques es caracteritzaven per la reducció de limfòcits T supressors en la sang, però està demostrat que aquesta és una característica inconstant.

Les proves histològiques suggereixen que la destrucció es dóna només en uns quants oligodendròcits que es troben en les zones de desmielinització activa, però la resta d'oligodendròcits tenen poca capacitat de proliferació. En el seu lloc hi ha una entrada de cèl·lules oligodendroglials precursores, que maduraran fins convertir-se en oligodendròcits per tal de brindar als axons residuals nova mielina (Ropper et al., 2007).

Possiblement la lesió aguda s'inicia per un atac de les cèl·lules T-CD4. Per causes desconegudes, citocines proinflamatòries es secretarien perifèricament i entrarien al cervell i medul·la espinal, on alterarien la BHE trencant les unions epitelials estretes (*tight-junctions*), això la permeabilitzaria, obrint el pas a macròfags i cèl·lules T-CD4 que iniciarien el procés inflamatori i l'atac immunològic, i en conseqüència es produiria el dany neuronal. Dóna suport a aquesta hipòtesi, que en lesions actives s'observi un procés inflamatori, acompanyat d'alteracions en la BHE, i expressió local de quimiocines i citocines inflamatòries. (Lassmann et al., 2007), (Weiner, 2009).

La resposta adaptativa està desencadenada preferentment pels limfòcits T, però alguns experts creuen que la causa que ho desencadena és l'alteració de les cèl·lules Tregs), o un defecte en la seva regulació, i això provocaria alteracions en la regulació de les cèl·lules T-CD4. De fet, algunes teràpies tenen com a objectiu induir la funció de les Tregs. Les cèl·lules T-CD8 sembla que no tenen un paper massa rellevant, tot i que s'han trobat infiltrats de T-CD8 en les lesions (Sakaguchi et al., 2008), (Weiner, 2009).

8.3 Autoanticossos en l'esclerosi múltiple.

Fins fa poc el concepte de l'EM suggeria que la resposta immunològica desencadenada per les cèl·lules T era suficient per causar el dany neuronal, però estudis patològics suggereixen que els Acs contribueixen a iniciar les plaques i la desmielinització (Breij et al., 2008). A més, s'ha demostrat que molts dels malalts amb EM tenen autoanticossos en el sèrum i LCR (Villoslada et al., 2010).

8.3.1 Anticossos contra la mielina

Molts d'aquests autoanticossos reaccionen contra algun dels tres components proteïcs de la mielina:

- Una d'elles és **la proteïna bàsica de la mielina (MBP)**, de l'anglès *myelin basic protein*), es localitza a la capa més interna de la mielina i està implicada en el manteniment de l'estructura compacta, però el fet que es tracti d'un Ag intracel·lular dificulta que els Acs hi tinguin accés, i per tant qüestiona el paper patogènic dels Acs anti-MBP (Warren and Catz, 1989).
- L'altra és **la proteolipoproteïna (PLP)**, en la que succeeix una cosa similar a la MBP. Però també s'han descrit Acs anti-PLP en el LCR de pacients amb EM i malaltia activa en els quals no se'ls hi detectaven Acs anti-MBP. Altres autors però utilitzant les mateixes tècniques no han estat capaços de confirmar aquests resultats. També s'ha descrit un augment de cèl·lules B secretores de PLP en el LCR (Warren and Catz, 1994).

- I el tercer autoantigen principal es la **glucoproteïna mielínica oligodendrocítica (MOG)**, de l'anglès *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), una proteïna transmembrana tipus I que s'expressa exclusivament en el SNC, es localitza a la plasmembrana dels oligodendròcits i a la superfície de la baina de mielina, i té un únic domini d'immunoglobulina extracel·lular que permet que els autoanticossos hi tinguin fàcil accés, sense necessitat de produir un dany previ, ja que la proteïna està exposada (Kroepfl et al., 1996). Els Acs anti-MOG són capaços de produir desmielinització i exacerbar l'EAE (Stefferl et al., 1999), i això es produeix a través dels epítops conformacionals, doncs s'ha comprovat que aquests Acs no tenen cap efecte patogènic sobre els epítops lineals o pèptids. Per contra, cal comentar que la rellevància patogènica encara es qüestiona ja que els estudis de detecció d'aquests Acs en el sèrum o LCR de malalts amb EM respecte els controls o respecte malalts amb altres malalties neurològiques van donar resultats molt variables, fet que es podria atribuir a l'heterogenicitat de la població estudiada. Això implica per tant, que el valor diagnòstic i de pronòstic encara està per determinar (Breithaupt et al., 2003). Però dóna suport a la hipòtesi del rol patogènic dels Acs un estudi recent realitzat amb 325 pacients amb EM, en el que es va observar reactivitat contra 3 isoformes diferents de MOG, i els títols quantitatius es correlacionaven amb les característiques de la malaltia, tot i que no es correlacionaven amb un perfil concret de la malaltia (Menge et al., 2011).

8.3.2 Anticossos contra altres components proteics del SNC

També s'ha detectat la presència d'altres Acs dirigits contra components del SNC diferents de la mielina:

- Alguns malalts tenen Acs contra la **neurofascina (NF)**, una proteïna de la família de les molècules d'adhesió, que té dues isoformes i tant la NF155 com a la NF186 (que deriven del mateix gen i es formen per un processament alternatiu) tenen dominis extracel·lulars amb dominis immunoglobulina, idèntics a la fibronectina, el que afavoreix la reactivitat creuada dels Acs contra aquestes proteïna. La NF155 és una proteïna mielínica produïda per l'oligodendroglia que

es localitza en la regió juxtaparanodal, i contribueix a la unió de la baina de mielina amb l'axó. La NFI186 és una proteïna neuronal situada a la superfície del segment inicial dels axons mielinitzats i al nòdul de Ranvier, i contribueix a mantenir l'arquitectura molecular que permet la conducció saltàtoria en el nòdul de Ranvier. L'efecte patogènic dels Acs contra la NF ha estat demostrat en experiments *in-vitro* en els que s'ha observat que aquests Acs indueixen déficits electrofisiològics en l'hipocamp amb un efecte patogènic dependent de complement, i en models animals s'ha demostrat que pot exacerbar la gravetat de l'EAE, produint un dany axonal agut però reversible, i associat als depòsits de C9 (un component del complement) (Mathey et al., 2007), (Pomicter et al., 2010).

- Fa poc la **contactina-2** ha estat identificada com un autoantigen reconegut tant per les cèl·lules T com pels Acs en alguns malalts amb EM. La contactina-2 és una proteïna expressada en els oligodendròcits, cèl·lules de Schwann, i en la regió juxtaparanodal de les fibres mielinitzades, i també s'expressa en les neurones de la substància gris de l'hipocamp i medul·la espinal. No hi ha massa estudis realitzats sobre aquesta proteïna, però la seva localització suggerix que l'autoimmunitat enfront la contactina-2 podria estar implicada en les lesions de la substància gris dels malalts amb EM. De fet, estudis funcionals en el model animal EAE mostren que les cèl·lules T-específiques de TAG-1 (proteïna murina homòloga a la contactina-2) i els Acs contra TAG-1, indueixen inflamació de la substància gris en els animals. A més s'ha demostrat que la proliferació de cèl·lules T-específiques de contactina-2 és major en pacients amb EM respecte els grups control, i aquesta resposta específica d'Ag s'associa a la secreció d'IL-17, interferó-gamma, i citocines neuroinflamatòries (Derfuss et al., 2009), (Derfuss et al., 2010).
- Per un altre costat recentment (al 2012), s'ha identificat un nou autoanticòs, que reacciona contra la molècula **Kir4.1** (de l'anglès *inward rectifying potassium channel*), present en el 46.9% dels pacients amb EM. Srivastava, Hemmer i el seu grup han demostrat per diverses tècniques (immunoprecipitació, immunoblot, i estudis amb models animals, entre altres) la presència d'Acs que reaccionen contra la part extracel·lular de la molècula Kir4.1 en malalts amb EM. Aquesta

proteïna està implicada en el manteniment del gradient electroquímic a través de la membrana, i és crítica per la correcta concentració del potassi. A més, experiments amb models murins en els quals se'ls hi havia injectat un sèrum amb IgG anti-Kir4.1 van mostrar que aquests Acs alteraven l'expressió de la proteïna glial GFAP (de l'anglès, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), induïen la pèrdua de la molècula Kir4.1 en astròcits i oligodendròcits, i activaven la via del complement, i a més van observar que els depòsits de complement es concentraven a les regions on es troava la delació de Kir4.1. No van trobar diferències significatives entre els títols d'Acs que tenien pacients amb la síndrome aïllada, EM remitent-recurrent o EM progressiva, ni tampoc van observar correlació entre la presència d'Acs i la clínica o les característiques del LCR (Srivastava et al., 2012).

Malgrat la falta d'especificitat dels Acs associats a l'EM, la seva detecció en els pacients reflecteix la presència d'una resposta immunològica activada, per tant haurien de ser potencialment útils com a marcadors diagnòstics de classificació i activitat clínica, tal com passa en altres malalties immuno-mediades, però fins l'actualitat no s'han pogut associar a una subclassificació immunopatogènica, la majoria d'Acs que es troben en malalts amb EM també es troben en altres síndromes i inclús en individus sans. Per una altra part, resulta complicat establir amb certesa si el paper dels Acs és patogènic, regulador, acompanyant, o inclús reparador, tot i que durant els últims anys s'està donant suport a la idea de que els Acs i les cèl·lules B poden tenir un paper important en la patogènia de l'EM, i dóna suport a aquesta hipòtesi la identificació del nou autoantigen Kir4.1. Els estudis del LCR revelen una associació entre la progressió de la malaltia i la producció intratecal d'IgG, el predomini de cèl·lules B i la presència de bandes oligoclonals d'IgM. A més, són evidents els resultats amb èxit dels tractaments amb immunomoduladors i immunosupressors que incideixen sobre l'aclariment dels Acs (plasmafèresi), o sobre la depleció de les cèl·lules B (Rituximab®, etc.). Possiblement les cèl·lules B tenen una funció central en la resposta immune al SNC que explicaria la persistència i estabilitat de les bandes oligoclonals en el LCR.

II. OBJECTIUS

II. OBJECTIUS

1. Caracteritzar el perfil clínic i immunològic de les encefalitis associades a anticossos contra antígens de membrana.
2. Identificar nous anticossos contra antígens de membrana implicats en la patofisiologia de les encefalitis paraneoplàsiques.
3. Caracteritzar el perfil clínic de pacients amb esclerosi múltiple i anticossos contra la proteïna contactina-2.

III. PUBLICACIONES

Article I

GABA_B receptor antibodies in limbic encephalitis and anti-GAD-associated neurologic disorders.

Boronat A, Sabater L, Saiz A, Dalmau J, Graus F

Neurology, 2011; 76(9):795-800

GABA_B receptor antibodies in limbic encephalitis and anti-GAD-associated neurologic disorders

A. Boronat, BSc
L. Sabater, PhD
A. Saiz, MD
J. Dalmau, MD, PhD
F. Graus, MD

Address correspondence and reprint requests to Dr. Francesc Graus, Servei de Neurologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain
fgraus@clinic.ub.es

ABSTRACT

Background: γ -Aminobutyric acid-B receptor antibodies (GABA_BR-ab) were recently described in 15 patients with limbic encephalitis (LE), associated with small-cell lung cancer (SCLC) or with concurrent glutamic acid decarboxylase (GAD) antibodies. We analyzed the frequency of GABA_BR-ab in 147 patients with LE or neurologic syndromes associated with GAD-ab.

Methods: We examined the presence of GABA_BR-ab in 70 patients with LE (33 paraneoplastic with onconeural antibodies, 18 paraneoplastic without onconeural antibodies [5 with Gad-ab], and 19 idiopathic with either GAD-ab [5 patients] or seronegative) and 77 patients with GAD-ab-associated neurologic syndromes other than LE (29 stiff-person syndrome, 28 cerebellar ataxia, 14 epilepsy, and 6 with diverse paraneoplastic neurologic syndromes). GABA_BR-ab were analyzed in serum or CSF by indirect immunofluorescence on HEK293 cells transfected with GABA_{B1} and GABA_{B2} receptor subunits.

Results: GABA_BR-ab were detected in 10 of the 70 patients with LE (14%). Eight had SCLC and 2 were idiopathic. One of the 8 patients with LE with SCLC had an additional onconeural antibody (Hu) and 2 GAD-ab. GABA_BR-ab were identified in 7 (70%) of the 10 patients with LE and SCLC without onconeural antibodies. GABA_BR-ab antibodies were not found in patients with GAD-ab and stiff-person syndrome, idiopathic cerebellar ataxia, or epilepsy. However, one patient with GAD-ab, paraneoplastic cerebellar ataxia, and anaplastic carcinoid of the thymus also presented GABA_BR-ab.

Conclusions: GABA_BR-ab are the most common antibodies found in LE associated with SCLC previously considered "seronegative." In patients with GAD-ab, the frequency of GABA_BR-ab is low and only observed in the context of cancer. *Neurology*® 2011;76:795–800

GLOSSARY

AMPAR = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; **BRSK** = brain serine/threonine kinase; **GABA_BR-ab** = γ -aminobutyric acid-B receptor antibodies; **GAD** = glutamic acid decarboxylase; **LE** = limbic encephalitis; **LGI1** = leucine-rich, glioma-inactivated 1; **NMDAR** = N-methyl-D-aspartate receptor; **PCD** = paraneoplastic cerebellar degeneration; **SCLC** = small-cell lung cancer; **SPS** = stiff-person syndrome; **VGKC** = voltage-gated potassium channel.

Recent studies show that some cases of encephalitis in adults and children may be caused by an autoimmune dysfunction that generates antibodies against surface proteins of the CNS synapses.¹ At present, the target antigens include the excitatory glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDAR) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPAR) receptors, the inhibitory γ -aminobutyric acid-B (GABA_B) receptor, and the leucine-rich, glioma-inactivated 1 (LGI1) protein.^{2–5}

Patients with any of these autoimmunities may present with a typical syndrome of limbic encephalitis (LE), characterized by short-term memory loss, behavioral disturbances, confusion, and seizures, or in the case of NMDAR antibodies, a widespread encephalitis expressed with subacute atypical psychosis, catatonia, dyskinetic, autonomic instability, and central hypoventilation. Overall, these disorders may be paraneoplastic or idiopathic, the associated

From the Service of Neurology (A.B., L.S., A.S., F.G.), Hospital Clinic and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; and Department of Neurology (J.D.), University of Pennsylvania, Philadelphia.

Study funding: Supported in part by grant PS09/0193 Fondo de Investigaciones Sanitarias, Madrid, Spain (F.G.), and National Cancer Institute/National Institute of Health, RO1CA89054 (J.D.).

Disclosure: Author disclosures are provided at the end of the article.

antibodies are probably pathogenic, and, unlike onconeural antibodies, the presence of these antibodies does not necessarily indicate that the patient has an underlying tumor.¹

Antibodies to GABA_B receptor (GABA_BR-ab) were recently identified in 15 patients with idiopathic or paraneoplastic LE.⁴ Seizures were the presenting clinical symptom in 13 patients. Seven of the 15 patients had lung tumors and 5 of these were small-cell lung cancer (SCLC). Three patients also had glutamic acid decarboxylase antibodies (GAD-ab). Ten patients received treatment for the LE and 9 showed neurologic improvement.⁴

We previously described that the concurrent detection of onconeural antibodies, particularly against amphiphysin, and antibodies against neuronal surface proteins was not unusual in patients with paraneoplastic LE and lung cancer.⁶ The aim of the present study was to analyze the presence of GABA_BR-ab in patients with paraneoplastic (with and without onconeural antibodies) and idiopathic LE, and neurologic syndromes associated with GAD-ab.

METHODS Patients. We reviewed 147 patients with final diagnosis of LE, or with other neurologic syndromes associated with GAD-ab whose serum or CSF was sent to our laboratory (Barcelona, Spain) for analysis of antineuronal antibodies. LE was defined by the subacute onset of short-term memory loss, behavior change, seizures, and involvement of the temporal lobes by EEG, imaging studies, or postmortem examination. LE was considered definite paraneoplastic if a tumor was diagnosed or the serum presented well-characterized onconeural antibodies (Hu, Yo, Ri, CV2, Ma2, amphiphysin).⁷ The diagnosis of definite idiopathic LE required the absence of cancer and well-

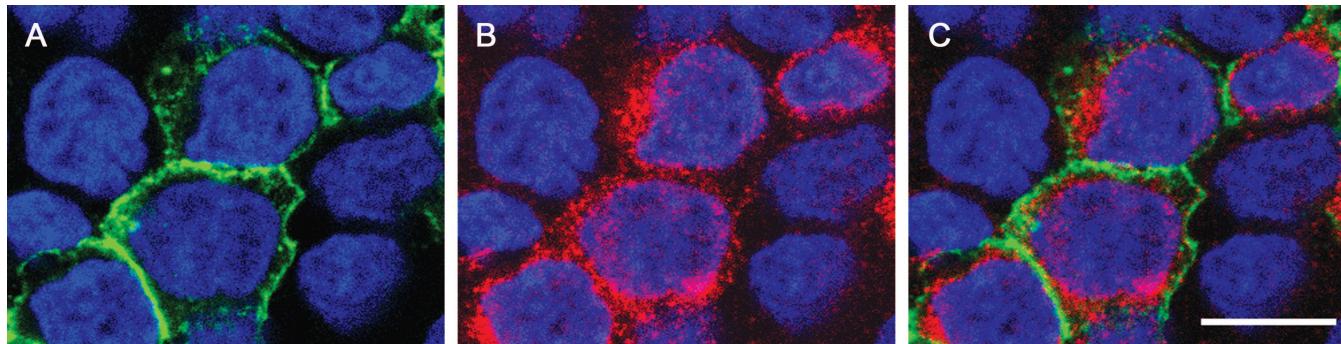
characterized onconeural antibodies, and a follow-up of at least 3 years. Patients with LE with a shorter follow-up were classified as possible idiopathic LE. Patients with GAD-ab were classified, as previously reported, in one of the following groups: stiff-person syndrome (SPS), cerebellar ataxia, isolated epilepsy, and paraneoplastic neurologic syndromes.⁸ The information was obtained from forms filled out by the referring neurologists, telephone interviews, and review of the clinical records.

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic. Samples are deposited in the collection of biological samples named "neuroimmunologia" registered in the biobank of Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

Immunologic studies. Onconeural antibodies, SOX1-ab, and GAD-ab were screened by immunohistochemistry performed on frozen sections of paraformaldehyde-perfused rat cerebellum using an avidin-biotin immunoperoxidase technique and confirmed by immunoblot when indicated.⁷ GAD-ab were confirmed by radioimmunoassay.⁸ Neuropil antibodies were screened by immunohistochemistry on frozen sections of rat brain postfixed with 4% paraformaldehyde.⁹ The presence of AMPA glutamate receptor antibodies was confirmed by immunofluorescence on HEK-293 cells transfected with plasmids containing the appropriate antigens,³ and voltage-gated potassium channel (VGKC) antibodies were confirmed by radioimmunoassay.

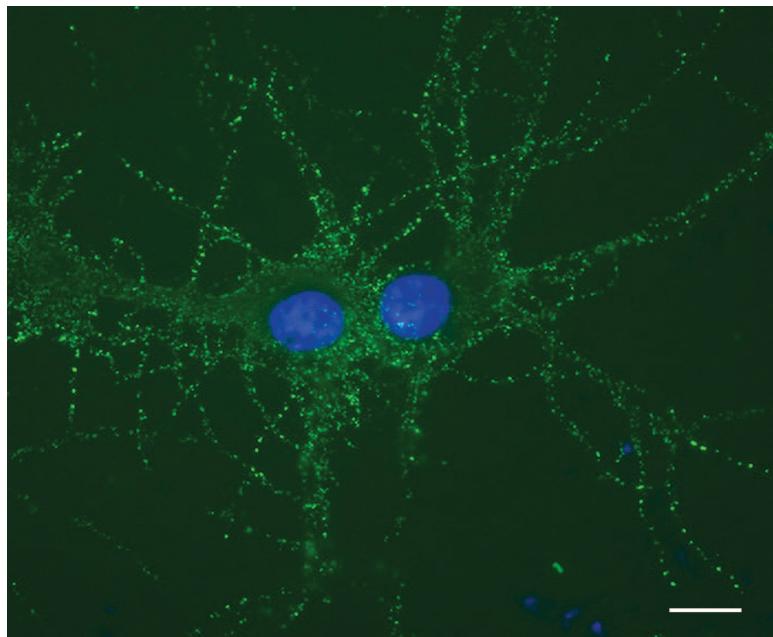
GABA_BR-ab were screened on HEK293 cells transfected with plasmids containing rodent GABA_{B1} and GABA_{B2} in equimolar ratios.⁴ Positive samples were also analyzed by immunocytochemistry of rat hippocampal neuronal cultures. Both techniques have previously been described.⁴ Briefly, HEK293 transfected cells were incubated with the patients' serum (dilution 1:20) or CSF (1:2) for 1 hour at 37°C, washed, fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with triton X, incubated with a rabbit polyclonal GABA_{B1} antibody (1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology, sc-14006; Santa Cruz, CA) followed by the appropriate Alexa Fluor secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR). For immunocytochemistry of rat hippocampal neuronal cultures, live neurons grown on coverslips were incubated with the patients' serum (1:100) or CSF (1:2) for 1 hour at 37°C, washed, fixed with 4% paraformaldehyde, and immunoreacted with antihuman immunoglobulin G Alexa Fluor second-

Figure 1 Detection of γ -aminobutyric acid-B receptor antibodies (GABA_BR-ab) using a HEK293 cell-based assay



HEK293 cells were transfected to express GABA_{B1/B2} receptor and incubated live, not permeabilized, with a patient's CSF. Afterwards, cells were fixed, permeabilized, and incubated with a polyclonal antibody against an intracellular epitope of the B1 subunit of the GABA_B receptor. Note that patient's CSF stains the cell surface of cells that specifically express GABA_B receptors (A), as demonstrated by the intracellular reporter antibody (B). Both reactivities are shown merged in C. Nuclei counterstained with DAPI. Scale bar = 20 μ m.

Figure 2 Primary culture of rat hippocampal neurons incubated in vivo with CSF of a patient with γ -aminobutyric acid-B receptor antibodies



There is an intense punctate reactivity in the neuronal membrane consistent with immunoreactivity against a surface antigen. Scale bar = 20 μ m.

ary antibody. Results were photographed under a fluorescence microscope using Zeiss Axiovision software (Zeiss, Thornwood, NY). To confirm the specificity of the neuronal reactivity, all positive samples were preabsorbed with the non-neuronal cell line HEK293 to remove antibodies that could react with non neuronal specific surface antigens.

RESULTS Eleven of the 147 patients tested positive for GABA_BR-ab on the screening of HEK293 cells transfected with the B1 and B2 subunits of the

GABA_BR (figure 1). All positive samples immunoreacted in vivo with primary cultures of hippocampal neurons (figure 2). GABA_BR-ab were positive in both serum and CSF in the 5 patients from whom paired samples were available. Median titer of GABA_BR-ab was 1/120 (range 40–2,000) in serum and 1/60 (range 20–640) in the CSF.

We found GABA_BR-ab in 10 patients with LE. Positive GABA_BR-ab were identified more frequently in the group of paraneoplastic LE without onconeural antibodies (previously considered “seronegative”) (table 1). Seven (39%) of the 18 patients were GABA_BR-ab-positive and all had SCLC. In total, positive GABA_BR-ab were identified in 7 (70%) of the 10 patients with LE and SCLC without onconeural antibodies. The other 3 patients were positive for AMPAR-ab. We previously demonstrated that 9 (39%) of 23 patients with paraneoplastic LE had concomitant onconeural or other antibodies against intraneuronal antigens, and antibodies against unidentified neuronal surface antigens.⁶ In this study, we analyzed 33 patients with LE and onconeural antibodies, and only one, with Hu-ab and SCLC, tested positive for GABA_BR-ab. However, 4 of the 7 patients with LE with GABA_BR-ab without onconeural antibodies presented antibodies against intracellular antigens (table 2). Two patients had GAD-ab (one also SOX1-ab), one Hu-ab, and, in 2 cases previously reported, one had brain serine/threonine kinase (BRSK)2-ab and the other SOX1 and VGKC-ab.^{9,10}

No tumor was identified in the remaining 2 GABA_BR-ab-positive patients but the follow-up is too short to classify them as definite idiopathic LE. In the group of 10 patients with LE and GAD-ab, the coincidence of GABA_BR-ab and GAD-ab occurred in 2 patients with SCLC whereas the other 3 patients with paraneoplastic LE associated with other tumors (thymoma 2, lymphoma) were GABA_BR-ab-negative. None of the 5 patients with idiopathic LE and GAD-ab were positive for GABA_BR-ab (table 1).

A summary of the clinical features of the GABA_BR-ab-positive patients is presented in table 2. Nine of the 10 patients with GABA_BR-ab and LE were men. Median age was 60 years (range 47–70 years). Seizures were the predominant and presenting symptom in 8 patients and 2 required admission to the intensive care unit for control of the seizures. All patients also presented confusion, disorientation, memory loss, or behavior changes consistent with encephalitis predominantly involving the limbic system. The CSF disclosed mild lymphocyte pleocytosis in 4 patients. Brain MRI showed increased fluid-attenuated inversion recovery signal in one or both hippocampus and amygdala in 7 patients. In 4 of them the initial brain MRI was reported normal.

Table 1 Frequency of GABA_BR-ab in 147 patients with limbic encephalitis or GAD-ab-associated neurologic syndromes

Syndrome	No. of patients	GABA _B R-ab positive (%)	Comments on positive cases
Paraneoplastic LE	51	8 (16)	
With onconeural ab ^a	33	1 (3)	Hu-ab with SCLC
Without onconeural ab ^b	18	7 (39)	All SCLC, GAD-ab: 2
Idiopathic LE ^c	19	2 (14)	Short follow-up
GAD-ab-positive, non-LE	77	1 (1)	
Stiff-person syndrome	29	0 (0)	
Cerebellar ataxia	28	0 (0)	
Epilepsy	14	0 (0)	
Paraneoplastic	6	1 (17)	Cerebellar ataxia

Abbreviations: GABA_BR-ab = γ -aminobutyric acid-B receptor antibodies; LE = limbic encephalitis; SCLC = small-cell lung carcinoma.

^a Hu-ab (26), Ma2-ab (4), amphiphysin-ab (3). Lung cancer in 18 patients.

^b GAD-ab in 5 patients. Lung cancer in 11 patients (SCLC 10, non-SCLC 1).

^c GAD-ab in 5 patients. Definite idiopathic (≥ 3 years of follow-up without cancer) LE, 7 patients.

Table 2 Clinical features and outcome of patients with positive GABA_BR-ab

Case	Age, y/sex	Cancer	Presenting symptoms ^a	MRI temporal lesions	CSF pleocytosis (WBC)	Other antineuronal-ab	Treatment	Outcome
1	60/M	SCLC	Status epilepticus	Left	Yes (unknown)	None	Steroids, IVIg	Partial control of seizures (dead from ICU complications)
2	57/F	SCLC	Seizures, behavior change	Bilateral	No	None	Steroids, IVIg	Complete recovery ^b
3	66/M	SCLC	Seizures, confusion	Normal	Yes (18)	GAD	Steroids, IVIg	Not available (short follow-up)
4 ^c	47/M	SCLC	Seizures, behavior change, memory impairment	Bilateral	Yes (20)	SOX1, VGKC	Steroids, IVIg, chemotherapy	Partial recovery, relapsing course (dead from cancer progression)
5 ^d	69/M	SCLC	Seizures, memory impairment, confusion	Left	Traumatic	None	Chemotherapy	Partial response; dead from cancer-related treatment (3 mo)
6 ^b	70/M	SCLC	Seizures, memory impairment, confusion	Normal	No	GAD, SOX1	Steroids, IVIg, chemotherapy	No response; dead from cancer-related treatment (2 mo)
7	58/M	SCLC	Seizures, memory impairment	Bilateral	Yes (15)	Hu	Steroids, IVIg, chemotherapy	No response (dead from LE)
8 ^a	61/M	SCLC	Memory impairment	Bilateral	No	BRSK2	None	No response; lost when tumor was diagnosed 9 mo later
9	61/M	No	Confusion, seizures, behavior change	Normal	No	None	IVIg	Partial improvement; severe ICU neuropathy
10	50/M	No	Seizures, behavior and memory impairment	Bilateral	No	None	Antiepileptics only	Complete recovery
11	57/F	Carcinoid of thymus	Subacute cerebellar ataxia	Normal	No	GAD	Steroids	Complete recovery

Abbreviations: BRSK2 = brain serine/threonine kinase 2; GABA_BR-ab = γ -aminobutyric acid-B receptor antibodies; GAD = glutamic acid decarboxylase; IVIg = IV immunoglobulin; SCLC = small-cell lung cancer; WBC = white blood cells.

^a Predominant symptom listed first.

^b Recovery before the start of chemotherapy.

^c Patients previously reported in references ¹⁰ and ⁹.

^d Included in the initial series of GABAR-ab.⁴

Only one patient had hyponatremia. Seven patients were treated with steroids, IV immunoglobulins, or combination of both drugs. Three of the 8 patients with SCLC were also treated with chemotherapy. Only 2 patients made a complete recovery (one without cancer) and none of them had concurrent antineuronal antibodies. Partial responses to the indicated treatments were achieved in 4 with a relapse in one of them.

GABA_BR-ab were not detected in 71 patients with GAD-ab and nonparaneoplastic SPS, cerebellar ataxia, or epilepsy. In contrast, one of the 6 patients with paraneoplastic neurologic syndromes and GAD-ab was GABA_BR-ab positive (table 1). She was a 57-year-old woman with a known anaplastic carcinoid of the thymus and bone metastases. She developed nausea, vomiting, gait instability, and diplopia. Neurologic examination disclosed a normal mental status, bilateral horizontal nystagmus, and cerebellar gait ataxia. The patient was treated with oral steroids and the symptoms slowly resolved over the ensuing 3 months.

The other 5 GAD-ab-positive patients without GABA_BR-ab presented with paraneoplastic encephalomyelitis associated with pancreatic cancer¹¹ and cerebellar ataxia with breast cancer (2 patients), non-SCLC, and neuroendocrine thymic carcinoma.¹²

To see if GABA_BR-ab associate with other cases of paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD), we analyzed the serum or CSF of a series of 45 patients with PCD and lung cancer (35 with SCLC). The majority (73%) were included in a previous study.¹³ These patients had Hu-ab (15%) or voltage-gated calcium channel antibodies (50%). However, all were negative for GABA_BR-ab.

DISCUSSION The current study expands our knowledge of the profile of symptoms and immunologic associations of GABA_BR-ab. We found that GABA_BR-ab are the most common antibodies identified in patients with SCLC and LE previously considered “seronegative.” Although the occurrence of GABA_BR-ab and GAD-ab was observed in an initial series of 15 patients,⁴ when we tested a larger series of patients with several

types of neurologic syndromes associated with GAD-ab, GABA_BR-ab were only identified in those who had a paraneoplastic syndrome.

At the time of the initial description of Hu-ab as markers of neurologic syndromes associated with SCLC, we observed that up to 50% of patients with LE were "seronegative." The syndrome of these patients was highly restricted to the limbic system and seemed to improve more often after treatment of the cancer than that of patients with Hu-ab.¹⁴ In the current study, 7 of 10 (70%) patients with LE, SCLC without onconeural antibodies had GABA_BR-ab. The other 3 patients were positive for AMPAR-ab.^{3,15} Taken together, all patients with LE and SCLC previously considered seronegative for onconeural antibodies had antibodies against synaptic receptors. Although the series is small, the association between AMPAR-ab and SCLC seems to be less robust than that of GABA_BR-ab. Review of published cases and the current series shows that all 11 patients with paraneoplastic LE with GABA_BR-ab had SCLC (in one case a neuroendocrine tumor of the lung)⁴ whereas only 7 of 13 patients with AMPAR-ab had SCLC. Other tumors associated with AMPAR-ab were benign or malignant thymomas, non-SCLC, and breast cancer.^{3,15,16}

We previously reported the occurrence of SCLC-associated onconeural antibodies (Hu, amphiphysin, CV2) and antibodies to unidentified neuronal surface proteins in 4 of 11 (36%) patients with paraneoplastic LE.⁶ In the current study we show that Hu-ab and GABA_BR-ab only occurred in 1 of 33 patients, suggesting that this specific association is uncommon. In contrast, we confirm that 40% of these patients had antibodies that are markers of the underlying SCLC (SOX1,¹⁷ BRSK2⁹) or directed against VGKC or GAD.⁴

As reported, the clinical profile of patients with LE and GABA_BR-ab is not substantially different from that seen in other autoimmune LE. The high frequency of seizures was noted in the previous study and could be explained by the role of GABA_B receptors in the development of seizures.¹⁸ Since almost 50% of patients with all types of LE¹⁹ and the majority of cases with GAD antibodies develop seizures,^{8,20} this symptom does not predict that the underlying autoimmunity is against GABA_BR.

The clinical outcome of our patients was not as good as expected from an antibody-mediated encephalitis.²¹ However, many patients did not receive tumor treatment or died shortly from complications of the treatment, an important requirement for potential control of the neurologic dysfunction.^{2,22} One of the patients without cancer (patient 10) was treated only with antiepileptics and made a complete

recovery. His follow-up is too short and we cannot rule out the possibility of future neurologic relapses. Complete recovery in the absence of immunotherapy has been reported in patients with anti-NMDAR encephalitis and emphasizes the concept that autoimmune synaptic encephalitides are underdiagnosed.²³

In this study, all patients with concurrent GABA_BR-ab and GAD-ab had a paraneoplastic neurologic disorder. In the initial series, 2 of the 8 patients with idiopathic LE encephalitis had additional GAD-ab.⁴ We did not find GABA_BR-ab in patients with LE or isolated epilepsy with GAD-ab except in the 2 patients with SCLC. Our 5 patients with idiopathic LE and GAD-ab were women with a median age of 29 years and 4 presented with seizures. This profile is similar to that recently reported in a series of 9 patients.²⁰ One of the 2 patients with concurrent GABA_BR-ab and GAD-ab and idiopathic LE previously reported also had this phenotype. To determine how often both antibodies coincide in patients with idiopathic LE, we suggest routinely looking for GABA_BR-ab in all patients with LE suspected to be related to GAD-ab.

The only patient with GAD-ab and GABA_BR-ab without LE had a reversible cerebellar ataxia associated with carcinoid of the thymus. GABA_BR-ab titers were similar to those of patients with LE. GABA_B receptors are widely expressed in the brain with the highest levels in the hippocampus, thalamus, and cerebellum.²⁴ Therefore it is plausible that some patients with GABA_BR-ab may develop cerebellar rather than hippocampal dysfunction. Low titers of GABA_BR-ab have previously been reported in a patient with nonparaneoplastic cerebellar ataxia and GAD-ab.⁴ However, we did not find any case in our series of patients with nonparaneoplastic cerebellar ataxia with GAD-ab⁸ or with paraneoplastic cerebellar degeneration and lung cancer,¹³ suggesting that GABA_BR autoimmunity rarely causes cerebellar dysfunction.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Drs. Javier Arpa (Hospital La Paz, Madrid, Spain), Luis Brieva (Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain), Gonzalo Gámez-Leyva (Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres, Spain), Adolfo Jimenez Huete (Hospital Ruber Internacional, Madrid, Spain), and Bojan Roc (University Ljubljana, Ljubljana, Slovenia) for providing clinical information on their patients; and Mercé Alba and Eva Caballero for technical assistance.

DISCLOSURE

Dr. Boronat, Dr. Sabater, and Dr. Saiz report no disclosures. Dr. Dalmau has received royalties from a patent re: Ma2 autoantibody test and has patents pending re: NMDA and GABA_B receptor autoantibody tests (license fee payments received from EUROIMMUN AG); and receives research support from funding from EUROIMMUN AG and the NIH/NCI. Dr. Graus serves on the editorial board of *Lancet Neurology* and has received research support from Fondo Investigaciones Santitarias.

REFERENCES

1. Graus F, Saiz A, Dalmau J. Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS. *J Neurol* 2010;257:509–517.
2. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008;7:1091–1098.
3. Lai M, Hughes EG, Peng X, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 2009;65:424–434.
4. Lancaster E, Lai M, Peng X, et al. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol* 2010;9:67–76.
5. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010;9:776–785.
6. Graus F, Saiz A, Lai M, et al. Neuronal surface antigen antibodies in limbic encephalitis: clinical-immunologic associations. *Neurology* 2008;71:930–936.
7. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1135–1140.
8. Saiz A, Blanco Y, Sabater L, et al. Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. *Brain* 2008;131:2553–2563.
9. Sabater L, Gómez-Choco M, Saiz A, Graus F. BR serine/threonine kinase 2: a new autoantigen in paraneoplastic limbic encephalitis. *J Neuroimmunol* 2005;170:186–190.
10. Zuliani L, Saiz A, Tavolato B, Giometto B, Vincent A, Graus F. Paraneoplastic limbic encephalitis associated with potassium channel antibodies: value of anti-glial nuclear antibodies in identifying the tumour. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:204–205.
11. Hernández-Echebarría L, Saiz A, et al. Paraneoplastic encephalomyelitis associated with pancreatic tumor and anti-GAD antibodies. *Neurology* 2006;66:450–451.
12. Bataller L, Valero C, Díaz R, et al. Cerebellar ataxia associated with neuroendocrine thymic carcinoma and GAD antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:696–697.
13. Graus F, Lang B, Pozo-Rosich P, Saiz A, Casamitjana R, Vincent A. P/Q type calcium-channel antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration with lung cancer. *Neurology* 2002;59:764–766.
14. Alamowitch S, Graus F, Uchuya M, Reñé R, Bescansa E, Delattre JY. Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features. *Brain* 1997;120:923–928.
15. Graus F, Boronat A, Xifré X, et al. The expanding clinical profile of anti-AMPA receptor encephalitis. *Neurology* 2010;74:857–859.
16. Bataller L, Galiano R, García-Escrig M, et al. Reversible paraneoplastic limbic encephalitis associated with antibodies to the AMPA receptor. *Neurology* 2010;74:265–267.
17. Sabater L, Titulaer M, Saiz A, Verschuuren J, Güre AO, Graus F. SOX1 antibodies are markers of paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 2008;70:924–928.
18. Schuler V, Lüscher C, Blanchet C, et al. Epilepsy, hyperesthesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron* 2001;31:47–58.
19. Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain* 2000;123:1481–1494.
20. Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2010;67:470–478.
21. Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain* 2005;128:1764–1777.
22. Graus F, Keime-Guibert F, Reñé R, et al. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 2001;124:1138–1148.
23. Niehusmann P, Dalmau J, Rudlowski C, et al. Diagnostic value of N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in women with new-onset epilepsy. *Arch Neurol* 2009;66:458–464.
24. Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 2004;84:835–867.

Article 2

The expanding clinical profile of anti-AMPA receptor encephalitis.

Graus F, Boronat A, Xifró X, Boix M, Svigelj V, García A, Palomino A, Sabater L, Alberch J, Saiz A.

Neurology, 2010; 74(10):857-9

Neurology®

THE EXPANDING CLINICAL PROFILE OF ANTI-AMPA RECEPTOR ENCEPHALITIS

F. Graus, A. Boronat, X. Xifró, et al.

Neurology 2010;74:857

DOI 10.1212/WNL.0b013e3181d3e404

This information is current as of September 24, 2012

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://www.neurology.org/content/74/10/857.full.html>

Neurology ® is the official journal of the American Academy of Neurology. Published continuously since 1951, it is now a weekly with 48 issues per year. Copyright © 2010 by AAN Enterprises, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0028-3878. Online ISSN: 1526-632X.



Clinical/Scientific Notes

F. Graus, MD
A. Boronat, BSc
X. Xifró, PhD
M. Boix, MD
V. Svilgelj, MD
A. García, MD
A. Palomino, MD
L. Sabater, PhD
J. Alberch, MD, PhD
A. Saiz, MD

THE EXPANDING CLINICAL PROFILE OF ANTI-AMPA RECEPTOR ENCEPHALITIS

Antibodies to the glutamate receptor 1 (GluR1) and GluR2 subunits of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor (AMPAR-ab) were recently described in 10 patients from a series of 109 with limbic encephalitis (LE).¹ Besides the hippocampus, GluR1/2 subunits of AMPAR are also widely expressed in the cerebral cortex, basal ganglia, and cerebellum,² suggesting that the clinical presentation could also extend beyond the clinical profile of LE. In this study, we analyzed the presence of AMPAR-ab in a consecutive series of patients whose serum or CSF was sent to our laboratory for analysis of antineuronal antibodies in the last 2 years.

Methods. We review all patients with final diagnosis of limbic encephalitis³ or with an immunohistochemical pattern of NMDAR-ab or AMPAR-ab in the serum or CSF (figure e-1 on the *Neurology*[®] Web site at www.neurology.org). AMPAR-ab immunoreactivity on brain sections was confirmed on HEK293 cells transfected with plasmids containing rodent GluR1/2 subunits as described (figure).¹ The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Clinic.

Results. We identified 30 patients: 17 had typical LE associated with antibodies to voltage-gated potassium channels (4), glutamic acid decarboxylase (4), AMPAR (2), adenylate kinase 5⁴ (1), and Hu (1). Five patients were seronegative. The other 13 patients with an immunohistochemical pattern of NMDAR-ab or AMPAR-ab had encephalitis that did not fulfill the criteria of LE.³ Eleven patients had NMDAR-ab and all presented with behavior changes followed by seizures, dyskinesias, catatonia, and, sometimes, hypoventilation.⁵ The other 2 patients had AMPAR-ab. In total, we found 4 (13%) patients with AMPAR-ab. All were women with an age range between 51 and 71 years. In one of them, AMPAR-ab was detected only in the CSF. AMPAR-ab immunoreactivity was identified in post-fixed rat sections as previously recommended¹ but also on paraformaldehyde-perfused brain sections routinely used to screen onconeural antibodies.⁶ Two of the pa-

tients presented with LE antedating the diagnosis of small cell lung cancer. Both patients responded to treatment with steroids and chemotherapy. The other 2 patients had a different clinical presentation resembling acute psychosis.

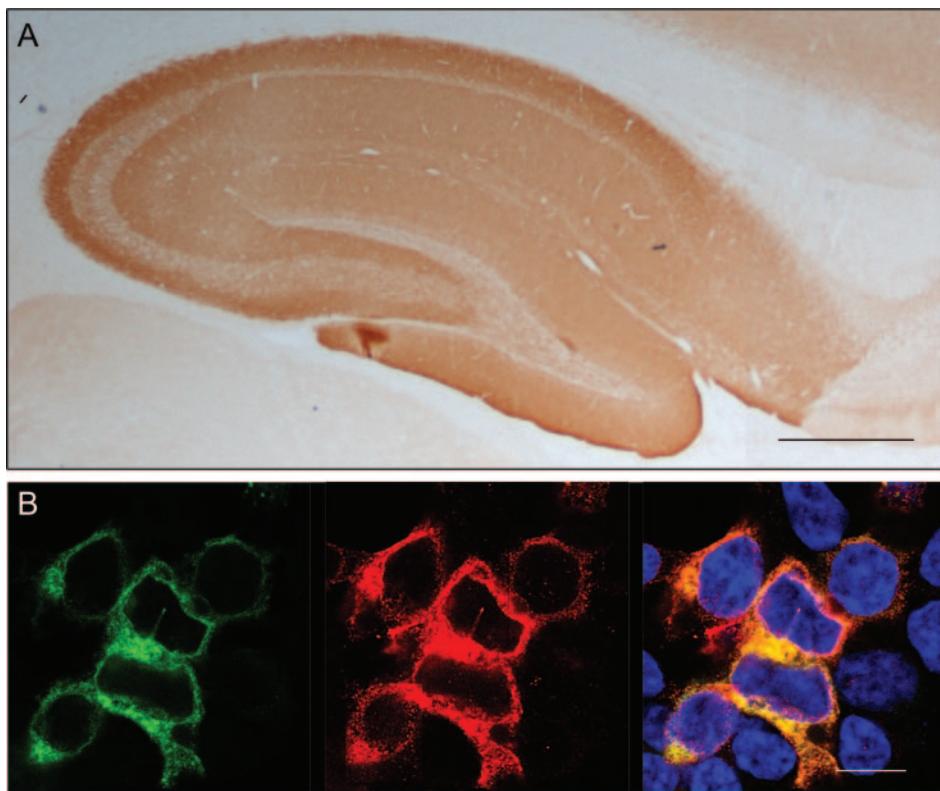
Patient 1. A 60-year-old woman developed rapidly progressive confusion, agitation, and aggressive behavior 3 days after surgery for hemorrhoids under local anesthesia. Past medical history was relevant for a malignant thymoma treated with radiotherapy and chemotherapy 6 years earlier without evidence of relapse. She was initially admitted to the psychiatric unit and treated with neuroleptics without improvement. The neurologic examination did not reveal focal deficits. CSF examination and brain MRI were normal. The EEG presented diffuse slowing with occasional sharp waves over the frontal regions. Chest CT scan revealed possible residual thymoma without evidence of relapse. Treatment with corticosteroids was followed by complete recovery.

Patient 2. This 58-year-old woman developed in 1 week confusion, personality changes with apathy, and episodes of aggressive behavior. During the neurologic examination, the patient was confused and aggressive, with poor collaboration. No focal deficits were observed except for aphasia characterized by low verbal output, paraphasias, agrammatic speech, and poor nomination and repetition. Routine systemic immunologic workup was negative. Whole body PET, brain MRI, and CSF studies were normal. EEG disclosed a normal background rhythm with episodic slow waves in frontal lobes. Symptoms did not respond to neuroleptics but they resolved with corticosteroids.

Discussion. Our study indicates that the detection of AMPAR-ab should be considered in patients, particularly women older than 50 years, who present, not only with LE, but also with rapidly progressive abnormal behavior resembling acute psychosis, and that the absence of the antibodies in serum does not preclude their presence in the CSF. We found that the clinical presentation of patients with AMPAR-ab was not restricted to that of LE. Two of our patients presented with a syndrome of atypical psychosis. The normal findings in the brain MRI and CSF studies did not provide a clue that

Supplemental data at
www.neurology.org

Figure Immunoreactivity of antibodies against AMPA receptors



(A) Section of paraformaldehyde-perfused rat brain incubated with the CSF of a patient with AMPAR-ab. There is a robust reactivity with the neuropil of hippocampus. Bar = 25 μ m. (B) HEK293 cells transfected with GluR1/2 AMPAR subunits show intense reactivity with the positive CSF (green) that colocalizes (yellow) with the labeling of a monoclonal antibody to GluR1 (Chemicon) (red). Bar = 10 μ m.

the cause of the syndrome could be immune-mediated. One of the patients, in addition to personality changes, developed a speech disorder suggestive of expressive aphasia. This presentation has been described in patients, particularly children, with anti-NMDA receptor encephalitis.⁷ AMPAR-ab were only detected in the CSF in one of the patients. This finding is also described in patients with NMDAR-ab where the CSF concentration of NMDAR-ab is usually higher than in sera and in some cases the NMDAR-ab in serum are also undetectable.⁵ Finally, AMPAR-ab were also identified in paraformaldehyde-perfused rat brain that is commonly used in reference laboratories to screen for onconeural antibodies.⁶ However, more samples must be studied to see if this method has the same sensitivity as the recommended immunohistochemistry on post-fixed brain sections.¹

From the Service of Neurology (F.G., A.B., L.S., A.S.), Hospital Clinic, and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona; Department of Cell Biology, Immunology and Neurosciences (X.X., J.A.), Universitat de Barcelona, Barcelona; Service of Neurology (M.B., A.G.), Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca; Service of Neurology (A.P.), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; and Department of Neurology (V.S.), University Medical Center, Ljubljana, Slovenia.

Study funding: Supported in part by Fondo de Investigaciones Sanitarias, Madrid, Spain (PS09/00193).

Disclosure: Dr. Graus, Dr. Boronat, and Dr. Xifró report no disclosures. Dr. Boix has received travel expenses for educational activities not funded by industry. Dr. Svigelj, Dr. García, Dr. Palomino, Dr. Sabater, Dr. Alberch, and Dr. Saiz report no disclosures.

Received September 20, 2009. Accepted in final form December 10, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Francesc Graus, Servei de Neurologia, Hospital Clínic Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain; fgraus@clinic.ub.es

Copyright © 2010 by AAN Enterprises, Inc.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Mercè Albà and Eva Caballero for technical assistance and Dr. Josep Dalmau (University of Pennsylvania) for help in technical aspects of the detection of AMPAR-ab.

1. Lai M, Hughes EG, Peng X, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. Ann Neurol 2009;65:424–434.
2. Sprengel R. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. Cell Tissue Res 2006;326:447–455.
3. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004;75:1135–1140.

4. Tüzün E, Rossi JE, Karner SF, Centurion AF, Dalmau J. Adenylate kinase 5 autoimmunity in treatment refractory limbic encephalitis. *J Neuroimmunol* 2007;186:177–180.
5. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008;7:1091–1098.
6. Vincent A, Honnorat J, Antoine JC, Giometto B, Dalmau J, Lang B. Autoimmunity in paraneoplastic neurological disorders. *J Neuroimmunol* 1998;84:105–109.
7. Florance NR, Davis RL, Lam C, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol* 2009;66:11–18.

CDC, AAN to Health Care Professionals: Monitor Patients for GBS

The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the American Academy of Neurology (AAN) collaborated to reach out to neurologists across the US to monitor and report any possible new cases of Guillain-Barré syndrome (GBS) following 2009 H1N1 flu vaccination.

Neurologists and health care professionals nationwide who diagnose patients with vaccine-associated GBS should use the CDC and FDA Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) to report their observations.

In addition, neurologists and all health practitioners in the 10 Emerging Infections Program (EIP) states—California, Connecticut, Maryland, Minnesota, New Mexico, New York, Colorado, Oregon, Georgia, and Tennessee—are asked to report all new cases of GBS, regardless of vaccination status, to their state’s surveillance officer.

The AAN hosted a series of webinars providing an in-depth look at H1N1 vaccination and how it may pose a risk for GBS and information about the vaccination monitoring campaign.

For additional information about the monitoring campaign, or to watch the webinars or download VAERS form and information on reporting to surveillance officers in your state, visit the AAN’s GBS toolkit page, www.aan.com/view/gbstoolkit.

THE EXPANDING CLINICAL PROFILE OF ANTI-AMPA RECEPTOR ENCEPHALITIS

F. Graus, A. Boronat, X. Xifró, et al.

Neurology 2010;74:857

DOI 10.1212/WNL.0b013e3181d3e404

This information is current as of September 24, 2012

Updated Information & Services	including high resolution figures, can be found at: http://www.neurology.org/content/74/10/857.full.html
Supplementary Material	Supplementary material can be found at: http://www.neurology.org/content/suppl/2010/03/07/74.10.857.DC1.html
References	This article cites 7 articles, 1 of which can be accessed free at: http://www.neurology.org/content/74/10/857.full.html#ref-list-1
Citations	This article has been cited by 5 HighWire-hosted articles: http://www.neurology.org/content/74/10/857.full.html#related-urls
Subspecialty Collections	This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s): Autoimmune diseases http://www.neurology.org/cgi/collection/autoimmune_diseases Encephalitis http://www.neurology.org/cgi/collection/encephalitis Paraneoplastic syndrome http://www.neurology.org/cgi/collection/paraneoplastic_syndrome Psychosis http://www.neurology.org/cgi/collection/psychosis
Permissions & Licensing	Information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at: http://www.neurology.org/misc/about.xhtml#permissions
Reprints	Information about ordering reprints can be found online: http://www.neurology.org/misc/addir.xhtml#reprintsus



Article 3

Encephalitis and antibodies to DPPX, a subunit of KV4.2 potassium channels.

Boronat A, Gelfand JM, Gresa-Arribas N, Jeong Hyo-Young, Walsh Michael, Roberts J Kirk, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld M, Balice-Gordon, Graus F, Bernardo R, Dalmau J

Annals of Neurology 2012. DOI: 10.1002/ana.23756

Encephalitis and Antibodies to Dipeptidyl-Peptidase-Like Protein-6, a Subunit of Kv4.2 Potassium Channels

Anna Boronat, BS,¹ Jeffrey M. Gelfand, MD,² Nuria Gresa-Arribas, PhD,¹ Hyo-Young Jeong, PhD,³ Michael Walsh, MD,⁴ Kirk Roberts, MD,⁵ Eugenia Martinez-Hernandez, MD,⁶ Myrna R. Rosenfeld, MD, PhD,^{1,7} Rita Balice-Gordon, PhD,⁸ Francesc Graus, MD,¹ Bernardo Rudy, PhD,³ and Josep Dalmau, MD, PhD^{1,7,9}

Objective: To report a novel cell surface autoantigen of encephalitis that is a critical regulatory subunit of the Kv4.2 potassium channels.

Methods: Four patients with encephalitis of unclear etiology and antibodies with a similar pattern of neuropil brain immunostaining were selected for autoantigen characterization. Techniques included immunoprecipitation, mass spectrometry, cell-base experiments with Kv4.2 and several dipeptidyl-peptidase-like protein-6 (DPPX) plasmid constructs, and comparative brain immunostaining of wild-type and *DPPX*-null mice.

Results: Immunoprecipitation studies identified DPPX as the target autoantigen. A cell-based assay confirmed that all 4 patients, but not 210 controls, had DPPX antibodies. Symptoms included agitation, confusion, myoclonus, tremor, and seizures (1 case with prominent startle response). All patients had pleocytosis, and 3 had severe prodromal diarrhea of unknown etiology. Given that DPPX tunes up the Kv4.2 potassium channels (involved in somatodendritic signal integration and attenuation of dendritic back-propagation of action potentials), we determined the epitope distribution in DPPX, DPP10 (a protein homologous to DPPX), and Kv4.2. Patients' antibodies were found to be specific for DPPX, without reacting with DPP10 or Kv4.2. The unexplained diarrhea led to a demonstration of a robust expression of DPPX in the myenteric plexus, which strongly reacted with patients' antibodies. The course of neuropsychiatric symptoms was prolonged and often associated with relapses during decreasing immunotherapy. Long-term follow-up showed substantial improvement in 3 patients (1 was lost to follow-up).

Interpretation: Antibodies to DPPX are associated with a protracted encephalitis characterized by central nervous system hyperexcitability (agitation, myoclonus, tremor, seizures), pleocytosis, and frequent diarrhea at symptom onset. The disorder is potentially treatable with immunotherapy.

ANN NEUROL 2012;00:000–000

The discovery that memory, behavior, cognition, and thought processes can be altered by autoantibodies has changed the approach to the diagnosis and treatment of neuropsychiatric disorders previously considered idiopathic. Since 2007, 7 such antibodies have been identified (anti-NMDAR, AMPAR, GABA[B], LGI1, Caspr2,

GlyR, and mGluR5), all targeting cell surface proteins involved in synaptic transmission, plasticity, or nerve excitability, and associated with syndromes that although severe, often respond to immunotherapy.¹ Patients may be comatose for several months, with bizarre behaviors, abnormal movements, or refractory seizures, and still

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.23756

Received May 9, 2012, and in revised form Jul 28, 2012. Accepted for publication Sep 4, 2012.

Address correspondence to Dr Dalmau, ICREA-IDIBAPS, Hospital Clinic, University of Barcelona, Department of Neurology, c/ Villarroel 170, Barcelona, 08036, Spain. E-mail: Josep.dalmau@uphs.upenn.edu or jdalmau@clinic.ub.es

From the ¹Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer and Service of Neurology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

²Department of Neurology, Multiple Sclerosis Center, University of California at San Francisco, San Francisco, CA; ³Department of Physiology and Neuroscience and Department of Biochemistry, New York University School of Medicine, New York, NY; ⁴Department of Neurology, Princess Alexandra Hospital Brisbane, Woolloongabba, and University of Queensland, St Lucia, Australia; ⁵Department of Neurology, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York Presbyterian Hospital, New York, NY; ⁶Department of Neurology, Saint Paul Hospital, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁷Department of Neurology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA; ⁸Department of Neuroscience, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA; and ⁹Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona, Spain.

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

recover with immunotherapy and extended care support.² Considering that until recently these disorders were unknown, the relatively high frequency of some has been surprising. For example, in a center focused on the diagnosis and epidemiology of encephalitis (California Encephalitis Project), the frequency of anti-NMDAR encephalitis surpassed that of any individual viral encephalitis.³ For these reasons, similar immune mechanisms are increasingly being considered in patients who develop rapidly progressive neuropsychiatric symptoms in the context of encephalitis of unknown etiology, a situation that occurs frequently. Nowadays, about 70% of encephalitis of unclear etiology remains undiagnosed after extensive evaluation for infectious etiologies.⁴ In this setting, the identification of autoantibodies against neuronal cell surface antigens shifts the management to the use of immunotherapy and may extend the intensive care support in cases that otherwise might be considered futile. We report here the clinical and immunological features of 4 patients with prominent neuropsychiatric symptoms (preceded in 3 by intense diarrhea) and antibodies against a novel cell surface antigen, dipeptidyl-peptidase-like protein-6 (DPP6 or DPPX), a cell surface auxiliary subunit of the Kv4.2 potassium channels. In addition to the known robust expression of DPPX in the hippocampus and cerebellum, we show that DPPX is also expressed in the myenteric plexus.

Subjects and Methods

The observation of 4 patients with subacute onset of neuropsychiatric symptoms and serum or cerebrospinal fluid (CSF) antibodies showing a similar pattern of immunostaining of the neuropil of rodent hippocampus and cerebellum, as well as immunolabeling of the cell surface of dissociated cultured hippocampal neurons, led us to immunoprecipitate the target antigen. None of the patients had antibodies to previously known synaptic or cell surface proteins, including among others the antibodies attributed to voltage-gated potassium channels (measured by radioimmunoassay using protein complexes labeled with dendrotoxin), and antibodies against LGI1 or Caspr2. Serum or CSF of 210 subjects including patients with autoimmune inflammatory and noninflammatory encephalopathies, and normal individuals, served as controls (see Serum, CSF Samples, and Controls in the Supplementary Material).

Patients

Patients are described in detail below (index case) and in the Supplementary Material (Cases 2 and 3), and summarized in the Table. The 4th case was a 76-year-old man who developed prominent diarrhea and weight loss along with rapidly progressive confusion, cognitive decline, seizures, unsteady gait, and evidence of intrathecal immunoglobulin (IgG) production (IgG

index 1.49); he is not included in the Table due to limited information and lack of follow-up.

PATIENT 1 (INDEX CASE). A 61-year-old man with a history of obesity, hypertension, and adult onset diabetes mellitus was admitted for 4 weeks of abdominal pain and diarrhea followed by subacute change in mental status, characterized by depression, aggression, withdrawal, visual hallucinations, mutism, myoclonus, and an exaggerated startle response. Magnetic resonance imaging (MRI) of the abdomen showed a fatty liver but no evidence of tumor, and extensive gastrointestinal workup was negative for fecal leukocytes, clostridium difficile, parasites, and ova. Endoscopic biopsies from stomach, small bowel, and colon showed only chronic gastritis (serum *Helicobacter pylori* IgG positive without bacterium on histology). The diarrhea persisted for >1 month without other symptoms of autonomic dysfunction.

CSF, MRI, and electroencephalographic studies are described in the Table. CSF polymerase chain reaction for herpes simplex virus, varicella zoster virus, *Tropheryma whippelii*, and enterovirus were negative. Rheumatologic, paraneoplastic, and neuronal cell surface antibody panels (which also included the glycine receptor) were negative. Whole body computed tomography and positron emission tomography scans and testicular ultrasound did not reveal a cancer.

The patient was briefly intubated for worsening mental status, and treated with intravenous methylprednisolone (1,000mg/day × 5 days) with notable neurologic improvement. He was then placed on a prolonged oral steroid taper over 4 months and discharged to a skilled nursing facility. Four months later, he was readmitted with worsening mental status and a urinary tract infection. Treatment with antibiotics followed by intravenous (IV) Ig (2g/kg over 5 days) resulted in brief neurologic improvement. He subsequently developed sepsis and was transferred to the intensive care unit requiring a tracheotomy and percutaneous endoscopic gastrostomy tube. Repeated IV Ig did not improve his mental status. He was then treated with Rituximab (1,000mg IV × 2 doses 15 days apart), and the prednisone was titrated to 5mg every other day. The clinical course was complicated by urinary tract infections and pneumonia, and his mental status remained poor for 5 more months. At his best, he could mouth a few words and follow simple commands. One striking finding on the examination at this stage of disease was an exaggerated startle response to sound and touch. In addition, he exhibited frequent episodic myoclonus, oral dyskinesias, and paratonia; the muscle strength was normal.

He was eventually treated with plasma exchange. After the first exchange, he was able to converse readily with his examiners and answer questions, but not enough to participate in formal cognitive testing. Subsequently, he received monthly intravenous pulses of cyclophosphamide, with a steady but incomplete improvement in cognition. He was able to return home 15 months after symptom onset. On follow-up 21 months after symptom onset, and after having received 9 monthly doses of intravenous cyclophosphamide, he was still at

TABLE : Clinical Features, Treatment, and Outcome

Sex/Age, Initial yr	Main Symptoms	Other	CSF	Brain MRI	EEG	Antibody Titer*	Treatment, Ordered Chronologically	Outcome, Duration of FU
M/61	Abdominal pain, diarrhea, depression, aggression, withdrawal.	Paranoid delusions, visual hallucinations, mutism, resting tremor, myoclonus, exaggerated startle response.	Decreased level of consciousness, able to track but not follow commands, orofacial dyskinias. Suspected seizures.	July 2010: WBC 117, protein 82, no OCB. December 2010: WBC 9, protein 51, IgG index 1.36; May 2011: WBC 5, protein 50, IgG index 0.95; August 2011: WBC 1, protein 34, IgG index 0.92; May 2011: WBC 1, protein 40, IgG index 0.57.	Multiple MRIs: nonspecific patchy periventricular and subcortical white matter T2/FLAIR increased signal.	Video EEG: diffuse slowing, poor organization; no epileptic activity.	IV methylprednisolone, oral steroids: substantial improvement, but relapsed with steroid taper. IV Ig: mild improvement. Plasma exchange: substantial improvement. Cyclophosphamide: steady, but incomplete improvement.	Able to return home 15 months after symptom onset. Currently completing the 6th monthly cycle of cyclophosphamide. Oriented to person, place, and time, able to follow simple conversations. Occasional episodes of agitation. Persistent deficits in executive functioning, attention, concentration, visual-spatial functioning. FU = 21 months.
F/45	Diarrhea, 30kg weight loss, memory deficit, insomnia, anxiety.	Agitation, paranoia, hallucinations, anxiety, insomnia. Recurrent generalized seizures, episodes of status epilepticus. Myoclonus, coarse resting tremor. ANA >2,560.	Decreased level of consciousness, hyper-reflexia, orofacial movements, horizontal nystagmus.	WBC 15, normal protein, normal glucose, positive OCB.	Multiple MRIs normal.	Background with intermittent generalized theta, delta. PLEDs.	Serum 1:1,280, CSF 1:160.	IV methylprednisolone: no response. IV Ig: slow improvement. Rituximab: accelerated improvement. Remains on periodic rituximab. FU = 49 months.
F/58	None	Psychosis (admitted to psychiatry). Clinically suspected seizures. Congenital nystagmus. Single stranded DNA antibodies: no antibodies to dsDNA.	June 2006: WBC 11, protein 50, increased IgG index, positive OCB; April 2007: WBC 5, protein 52; December 2007: WBC 4, protein 53; April 2008: WBC 62, protein 62; September 2008: WBC 1, protein 81; December 2008: WBC 1, protein 71.	Multiple MRIs: nonspecific white matter changes. One showing nonacute but new right frontal infarction (biopsy = resolving infarction without vasculitis).	Slow background activity.	April 2008: CSF 1:80; September 2008: serum 1: 1,280, CSF 1:80	Prednisone: improvement (relapses at several tapers). IV Ig and rituximab: no clear effect. Cyclophosphamide: 1 cycle (no further cycles due to cryoprecipocal pneumonia). Plasma exchange: partial improvement.	Alert, attentive, fully oriented, normal short-term memory, knows current events. No tremor, myoclonus, or hallucinations. Walks with a slightly wide base. FU = 68 months.

ANA = antinuclear antibody; CSF = cerebrospinal fluid; dsDNA = double-stranded DNA; IgG = immunoglobulin; F = female; FLAIR = fluid attenuated inversion recovery; FU = follow-up; IgM = immunoglobulin; IV = intravenous; M = male; MRI = magnetic resonance imaging; OCB = oligoclonal bands; PLED = periodic lateralized epileptiform discharge; WBC = white blood cell count.

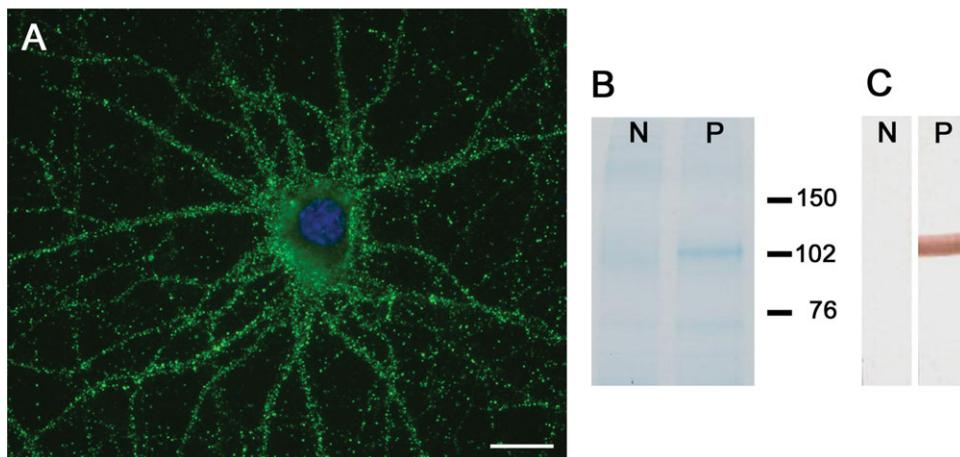


FIGURE 1: Immunoprecipitation of DPPX. (A) In cultures of dissociated rat hippocampal neurons, patients' antibodies showed intense reactivity with the neuronal cell surface. Bar = 10 μ m. (B) Immunoprecipitation of the antigen with serum of the index case; the precipitated proteins were run in a gel and subsequently stained with EZblue. Note that the patient's antibodies precipitated a protein (band close to 102kDa in lane P), which was excised from the gel and analyzed by mass spectrometry, demonstrating sequences of DPPX. Lane N is the precipitate obtained from control serum. (C) Immunoblot of these proteins with a rabbit polyclonal antibody against DPPX (1:1,000, developed by B.R.) confirmed that the band corresponded to DPPX.

home with family, but required assistance with many activities of daily living. On cognitive testing, orientation was relatively preserved but there were impairments in attention and concentration, executive functioning, abstraction, visual-spatial functioning, and phonemic fluency. Testing of verbal memory revealed successful encoding (cueing required). He scored 9 out of 30 points on the Montreal Cognitive Assessment. He has lost 45kg during the course of the disease.

Techniques Used for Detection of Novel Antibodies and Precipitation of the Autoantigen

The laboratory techniques used for antibody and antigen characterization, including immunohistochemistry on rodent tissue, immunocytochemistry with neuronal cultures, and immunoprecipitation, mass spectrometry, and immunoblot, have been previously reported^{5–8} and are shown in detail in the Supplementary Material.

IMMUNOCYTOCHEMISTRY ON HEK293 CELLS. HEK293 cells were transfected with plasmids containing rat DPPX-S (short cytoplasmic domain of 32 amino acids), DPPX-L (long cytoplasmic domain of 88 amino acids), DPPXed-myc (DPPX construct with extracellular domain deleted, and linked to a myc-tag), rat Kv4.2, human DPP10, or plasmid without insert (control).⁹ In other experiments, cells were cotransfected with DPPX and Kv4.2 in equimolar ratios. The reactivity of patients' antibodies was then assessed as previously reported⁷ using a double immunofluorescent assay with patients' serum or CSF and a commercial antibody against DPPX or Kv4.2 (see Supplementary Material).

IMMUNOHISTOCHEMISTRY WITH WILD-TYPE AND DPPX-NULL MICE. Wild-type and *DPPX*-null mice were generated and genotyped as previously reported.¹⁰ The brain and bowel were removed, processed, and examined by standard avidin-biotin-peroxidase immunohistochemistry or immunoflu-

orescence using patients' serum (1:200) or CSF (1:5) as indicated for brain and small bowel of rat (see Supplementary Material).

Results

All 4 patients (2 male, 2 female; age range, 45–76 years) developed a rapidly progressive encephalopathy characterized by agitation, delusions, hallucinations, and myoclonic jerks, which in 3 patients were associated with prominent diarrhea of unclear etiology. All had confirmed or clinically suspected seizures and CSF pleocytosis with evidence of intrathecal production of IgG or oligoclonal bands. Detailed information from 3 patients showed that after multiple immunotherapies all had substantial recovery at the last follow-up (18–68 months from symptom onset); minimal follow-up information was available for the 4th patient.

Identification of the Target Antigen as DPPX

All 4 patients had antibodies in serum or CSF that reacted with the neuropil of brain of rodents (Supplementary Fig 1) and the cell surface of live, nonpermeabilized cultures of dissociated rat hippocampal neurons (Fig 1A). Immunoprecipitation of the target antigen with serum of 1 of the patients, followed by electrophoretic protein separation and EZBlue gel staining, showed a distinct band of approximately 100kDa that was not present in the immunoprecipitate using a control serum (see Fig 1B). Excision of the band from the gel and analysis by mass spectrometry demonstrated that it contained sequences derived from DPPX (scores 6,441, 5,945, and 383; cutoff score for a confident protein identification,

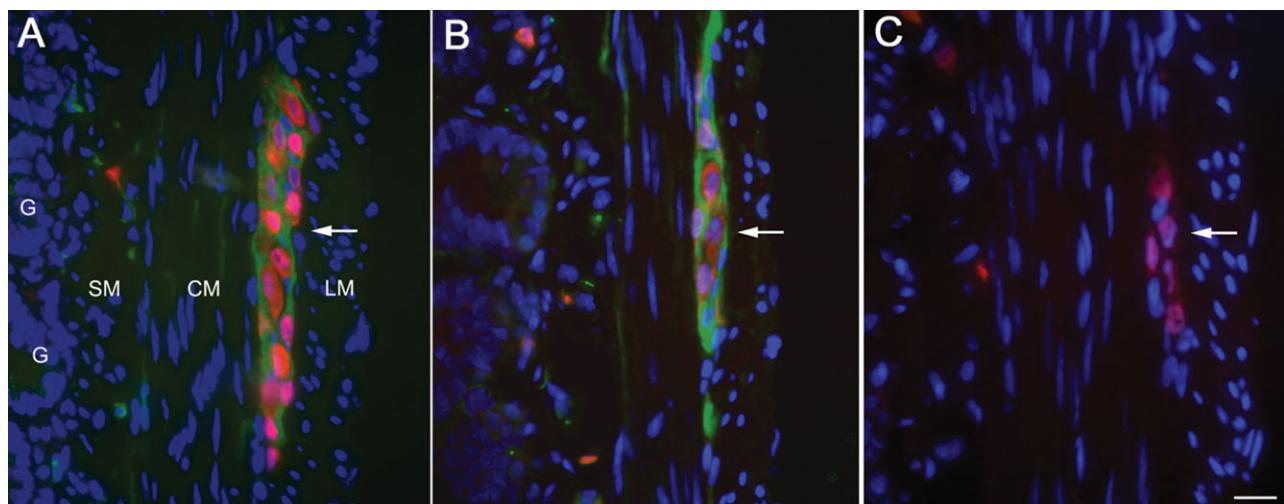


FIGURE 2: Expression of DPPX in myenteric plexus. Transverse section of small bowel of rat showing the longitudinal muscular layer (LM), circular muscular layer (CM), submucosal layer (SM), and glans (G). The myenteric plexus is revealed as clusters of large neurons between the 2 muscular layers. In the 3 panels (A–C) the nuclei of the neurons (red) was labeled with anti-Hu (a highly specific neuronal marker). (A) DPPX immunostaining (in green) using a rabbit polyclonal antibody (1:1,000); (B) DPPX reactivity of serum from 1 of the patients with encephalitis; (C) lack of reactivity of serum from a healthy subject. Note that DPPX is predominantly expressed in the cytoplasm and membrane of the large clustered neurons of the myenteric plexus, and is also detected in a fine longitudinal pattern in CM and SM where the submucosal plexus is located. Bar = 20 μ m.

≥ 70). This finding was confirmed by immunoblotting of the precipitate with an antibody specific for DPPX (see Fig 1C).

Immunohistochemical analysis of small bowel demonstrated that DPPX was specifically expressed by neurons of the myenteric plexus and that patients' antibodies also reacted with DPPX expressed in these neurons (Fig 2).

Patients' Antibodies Recognize Epitope Regions Contained in DPPX, but Not Kv4.2

HEK293 cells transfected with DPPX-S or DPPX-L showed similar reactivity with patients' serum or CSF, consistent with the recognition of an extracellular epitope (Fig 3 shows the reactivity with DPPX-L; similar reactivity was obtained with DPPX-S, not shown). Patients' antibodies did not react with cells expressing Kv4.2 (Supplementary Fig 2), and the reactivity with DPPX was not modified when it was coexpressed with Kv4.2 (data not shown). Further analysis using a DPPX plasmid in which the extracellular domain was deleted (DPPXed-myc)⁹ showed abrogation of reactivity with serum and CSF of Patients 1 and 4, and weak reactivity with serum and CSF of Patients 2 and 3, indicating that the latter 2 patients had antibodies against cell surface and intracellular epitopes (Supplementary Fig 3D, G). Although DPPX and DPP10 have 51% amino acid sequence identity,¹¹ patients' antibodies did not react with DPP10 (data not shown). Overall, these findings demonstrate that patients' antibodies specifically target DPPX, but not the Kv4.2 channel, and that some patients have anti-

bodies against both the extracellular and intracellular domains of DPPX.

We next determined in a cell-based assay coexpressing DPPX and Kv4.2 the reactivity of serum or CSF of the 210 controls. None of these subjects was found to have antibodies reacting against these 2 proteins, suggesting that antibodies against DPPX are specific to a subgroup of patients with autoimmune encephalitis. In contrast, a patient without encephalitis who had a thymoma and seronegative myasthenia gravis (included in the controls) had antibodies to DPP10, but not DPPX (Martinez-Hernandez, data not shown).

Analysis of Patients' Antibody Reactivity with Brain of DPPX-Null Mice

To further confirm the specificity of patients' antibodies for DPPX, immunohistochemistry with brain and bowel of wild-type mice was compared with that of *DPPX*-null mice. These experiments demonstrated abrogation of reactivity of serum or CSF of 3 patients (those shown in the Table) with brain and bowel of *DPPX*-null mice, indicating that patients' antibodies were directed only against DPPX (Fig 4 and Supplementary Fig 4). One patient had additional antibodies against a protein of unknown identity (see Fig 4H).

Discussion

We report 4 patients with a novel autoimmune disorder characterized by subacute development of cognitive dysfunction, agitation, hallucinations, confusion, resting

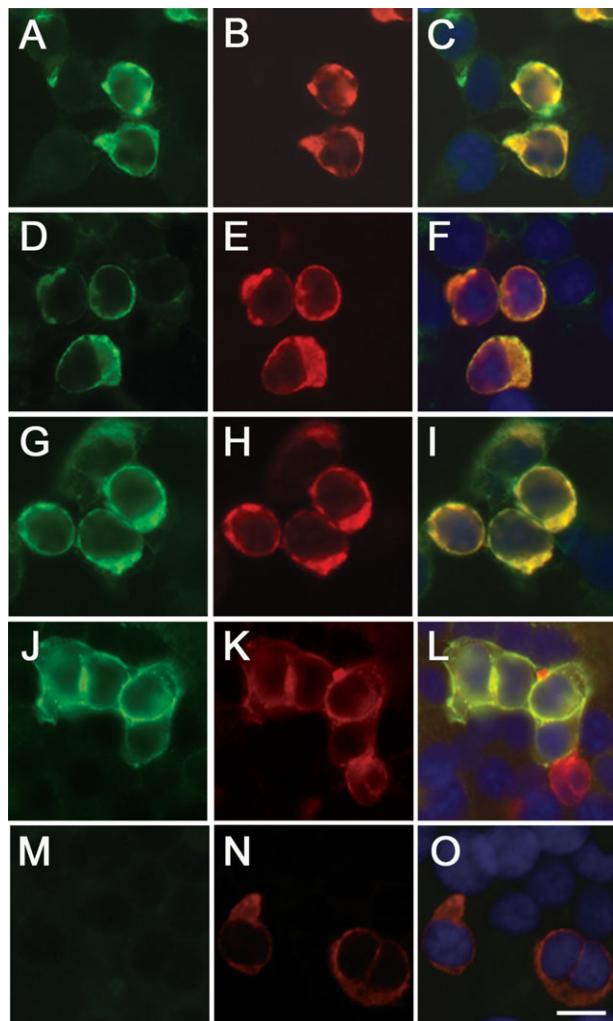


FIGURE 3: Analysis of DPPX antibodies using a cell-based assay. HEK293 cells expressing DPPX-L immunostained with (A, D, G, J) patients' serum and (B, E, H, K) a mouse monoclonal antibody against DPPX. The merged reactivities are shown in the corresponding panels (C, F, I, L). Similar studies comparing the serum of a healthy individual and the DPPX monoclonal antibody are shown in M and N, and the merged reactivities in O. Note that patients' antibodies immunoreact with cells expressing DPPX. Bar = 10 μ m.

tremor, and myoclonus in association with antibodies against DPPX, a cell surface auxiliary subunit of the Kv4.2 potassium channel. In 3 patients, the neurological symptoms were preceded or overlapped with severe diarrhea and weight loss to the point that 2 patients underwent extensive endoscopic biopsies without a clear diagnosis. Support for an autoimmune etiology of this disorder is provided by the presence of CSF pleocytosis, increased IgG index or oligoclonal bands, and the neurological response to intensive or persistent immunotherapy. Using patients' antibodies, 3 sets of experiments established DPPX as the main autoantigen: immunoprecipitation of DPPX from cultures of dissociated rat hippocampal neurons; immunostaining of DPPX in a cell-

based assay; and comparative brain immunostaining of wild-type and *DPPX*-null mice, showing abrogation of reactivity of patients' antibodies with the *DPPX*-null mice brain, and revealing in 1 patient additional antibodies to an unknown antigen.

DPPX has a critical role tuning up the Kv4.2 channels by remodeling channel gating.¹² This type of potassium channel belongs to the mammalian Shal K⁺ channel family,¹³ which has different properties compared with the Shaker K⁺ (Kv1) family, previously considered the target of antibody-associated limbic encephalitis, neuromyotonia, and Morvan syndrome (the main autoantigens are LGI1 and Caspr2).^{14,15} The Kv4.2 channels operate in the subthreshold range of membrane potentials.¹² This somatodendritic subthreshold A-type K⁺ current (I_{SA}) is a critical component of the ensemble of voltage-gated ionic currents that determine somatodendritic signal integration.¹⁶ In many neurons, action potentials that initiate in the axon hillock propagate down the axon but also back-propagate into the dendrites. In the dendritic tree, these action potentials serve as signals that report the status of the neuron's output. The transient subthreshold I_{SA} current in dendrites attenuates this back-propagation of action potentials. Under resting conditions, I_{SA} shuts the action potential as it tries to spread into the distal regions of the dendritic tree. However, when excitatory synaptic inputs and somatic action potentials are paired within a certain time window, the ensuing subthreshold depolarization in distal dendrites inactivates I_{SA} , and the attenuation of back-propagating the action potential is substantially reduced.¹³ It is believed that this interaction provides a coincidence detection mechanism that plays an important role in dendritic Ca⁺⁺ signaling, signal integration, and synaptic plasticity.^{12,13,16}

The function of the Kv4 channels is dependent on 2 auxiliary subunits, the intracellular Kv-channel-interacting proteins,¹⁷ and the extracellular DPPX, which is predominantly expressed in hippocampal pyramidal neurons and cerebellum, or DPP10, which has a different brain expression profile and is also present in pancreas.^{9,11} DPPX is composed of a short cytoplasmic N-terminus, a single transmembrane domain, and a large extracellular C-terminus. Depending on the length of the cytoplasmic domain, 2 adult forms, DPPX-S and DPPX-L, have been identified.^{18,19} Consistent with the presence of antibodies against extracellular epitopes, our 4 patients' serum and CSF equally recognized DPPX-S and DPPX-L, but 2 patients had additional antibodies against intracellular epitopes present in a mutant construct in which the extracellular C-terminus was deleted.

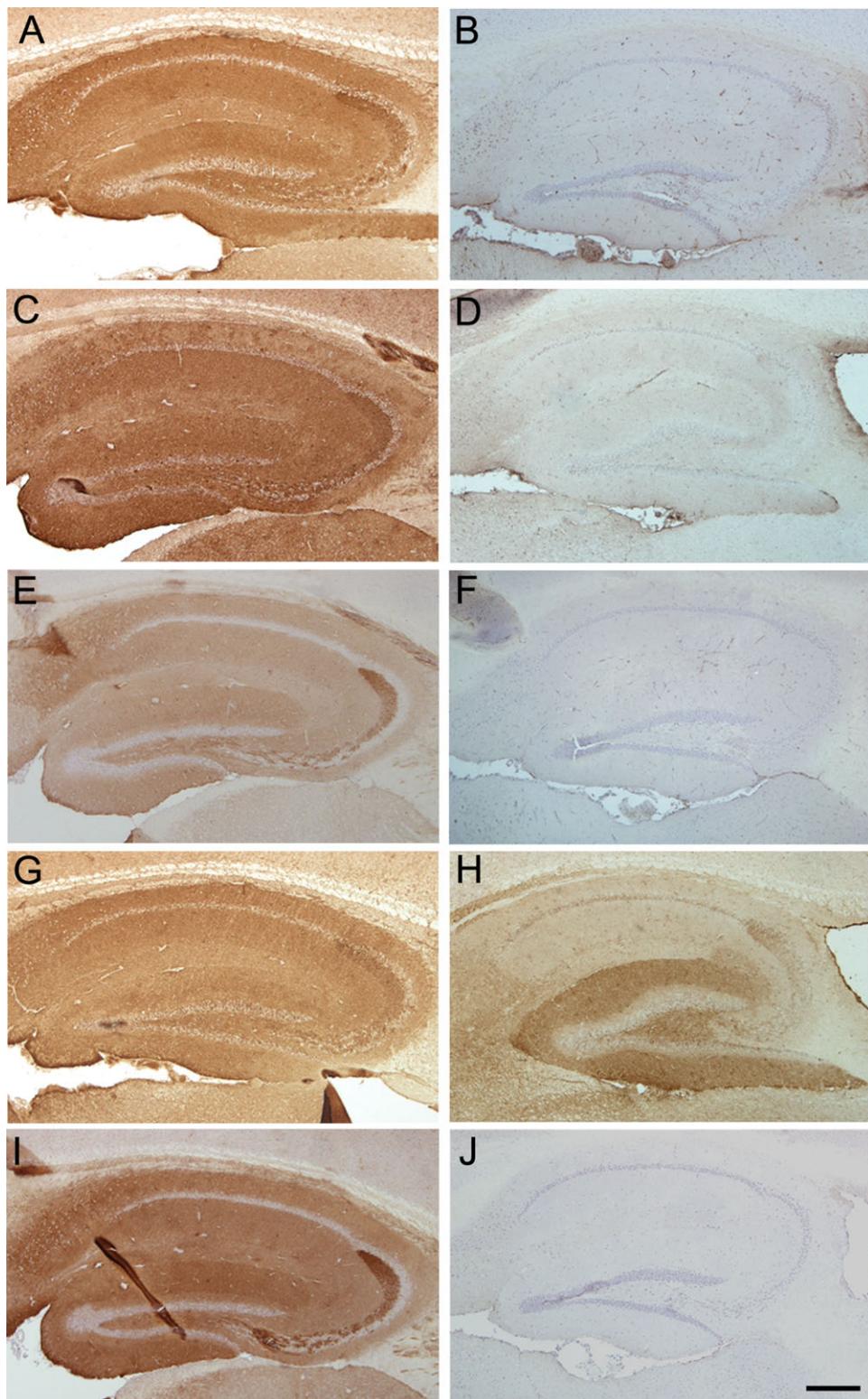


FIGURE 4: Comparison of patients' serum reactivity using brain from *DPPX*-null mutants and wild-type mice. The reactivity of patients' sera with the hippocampus of wild-type mice is shown in A, C, E, and G. The reactivity of a rabbit polyclonal DPPX antibody with the hippocampus of wild-type mice is shown in I. Panels on the right side show the results of a similar experiment but using the hippocampus of *DPPX*-null mice. Note that the reactivities of the sera of the first 3 patients (Cases 1, 2, and 3 of the Table) and the rabbit polyclonal DPPX antibody are abrogated in the hippocampus of *DPPX*-null mice (panels B, D, F, J). Patient 4, not included in the Table (panels G and H), showed remaining reactivity with the hippocampus of *DPPX*-null mice, indicating that this patient had 2 antibodies, 1 against DPPX and the other against an unknown antigen. Bar = 200 μ m.

The extensive evaluation and prolonged follow-up of 3 patients indicate that this disorder is severe, resulting in lengthy hospitalizations or multiple relapses that usually occurred while the immunotherapy was decreased. Patient 1 was able to return home 15 months after symptom onset, and had a clinical relapse while the prednisone was tapered. Patient 2 spent 10 months in the hospital and currently continues to receive rituximab treatments when the CD19 count starts to rise. On 1 occasion, delay of treatment resulted in symptom recurrence. Patient 3 had 7 relapses in 5 years, most related to attempts to decrease the dose of steroids.

The main symptoms of this disorder, including agitation, myoclonus, tremor, and seizures, although not characteristic of a specific syndrome, are compatible with neuronal hyperexcitability, and consistent with the increased excitability noted in electrophysiological studies of *DPPX*-knockouts.²⁰ Interestingly, a truncation mutation of Kv4.2 identified in a patient with temporal lobe epilepsy resulted in aberrant excitability of cells expressing the mutant channel.²¹ Altogether, these findings suggest that genetic or immunological alteration of the DPPX-Kv4.2 complex leads to neuronal hyperexcitability. In clinical practice, the combination of the neurological symptoms indicated above with severe diarrhea and non-organ-specific antibodies (eg, antinuclear antibody) may lead to a wide differential diagnosis, including among others Whipple disease or lupus erythematosus, as occurred in our patients.

At this time, the significance of the diarrhea is unclear, but this symptom is notable because it was severe, lasted for several weeks, and only occurred at the initial episode of encephalitis. Moreover, review of our experience with encephalitis suspected to be autoimmune suggests a link between diarrhea and DPPX antibody-associated encephalitis. Among 1,429 cases of encephalitis of unclear etiology examined by us in the past 4 years, only 11 had severe diarrhea at symptom onset. Three of these 11 patients correspond to the cases reported here, and the other 8 did not have DPPX antibodies; none of the 1,418 cases without diarrhea had serum or CSF brain reactivity like that shown by DPPX antibody-positive samples (see Supplementary Fig 1A). A plausible explanation for the association of diarrhea and DPPX antibody-associated encephalitis is that in some patients the immune response may result from molecular mimicry between DPPX and a yet unknown infectious agent. This paradigm would be similar to the mechanism that triggers GM1 autoantibodies in patients with Guillain-Barré syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. Moreover, the robust expression of DPPX by neurons of the myenteric plexus supports the possibility that patients' antibodies may alter the function of the plexus,

resulting in gastrointestinal hyperactivity, similar to the central nervous system hyperexcitability that occurs when DPPX is ablated in brain.²⁰

A practical implication of this study is that detection of antibodies to DPPX in patients with encephalitis of unclear etiology should prompt the use of immunotherapy. Although the frequency of this disorder is unknown, the triad of diarrhea, encephalitis with signs of hyperexcitability, and CSF pleocytosis will likely lead to the recognition of new cases.

Acknowledgment

This work was supported in part by grants from the NIH (National Institute Neurological Disorders and Stroke (NINDS) RO1NS077851, J.D.; National Institute of Mental Health (NIMH) RO1MH094741, R.B.-G. and J.D.), the National Cancer Institute (RO1CA089054; J.D.), Fundació la Marató (TV3; J.D.), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI11/01780, J.D.; FI08/00285, E.M.-H.; PS09/0193, F.G. and A.B.), and a McKnight Neuroscience of Brain Disorders award (R.B.-G. and J.D.). J.D. has received a research grant from Euroimmun, and receives royalties from patents for the use of Ma2 and NMDAR as an autoantibody test.

We thank Dr C. Glaser (California Encephalitis Project) for providing serum and CSF samples of 10 patients with encephalitis of unclear etiology, and Dr. Maggie Waung (MD, PhD) for providing clinical information.

Potential Conflicts of Interest

J.M.G.: grants/grants pending, American Academy of Neurology Clinical Research Training Fellowship; speaking fees, National MS Society; honoraria for writing editorial content, Neurology Journal Watch. M.R.R.: patents, royalties, Athena Diagnostics, Euroimmun. B.R.: employment, NYU School of Medicine; grants/grant pending NINDS. J.D.: grants/grants pending, NIH; patents, royalties, Athena Diagnostics, Euroimmun.

References

1. Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology* 2011;77:179–189.
2. Frechette ES, Zhou L, Galetta SL, et al. Prolonged follow-up and CSF antibody titers in a patient with anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology* 2011;76:S64–S66.
3. Gable MS, Sheriff H, Dalmau J, et al. The frequency of autoimmune N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis surpasses that of individual viral etiologies in young individuals enrolled in the California Encephalitis Project. *Clin Infect Dis* 2012;54:899–904.

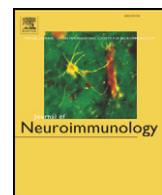
4. Gable MS, Gavali S, Radner A, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis: report of ten cases and comparison with viral encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1421–1429.
5. Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain* 2005;128:1764–1777.
6. Buchhalter JR, Dichter MA. Electrophysiological comparison of pyramidal and stellate nonpyramidal neurons in dissociated cell culture of rat hippocampus. *Brain Res Bull* 1991;26:333–338.
7. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008;7:1091–1098.
8. Lai M, Hughes EG, Peng X, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 2009;65:424–434.
9. Zagha E, Ozaita A, Chang SY, et al. DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem* 2005;280:18853–18861.
10. Clark BD, Kwon E, Maffie J, et al. DPP6 localization in brain supports function as a Kv4 channel associated protein. *Front Mol Neurosci* 2008;1:8.
11. Qi SY, Riviere PJ, Trojnara J, et al. Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J* 2003;373:179–189.
12. Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, et al. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* 2003;37:449–461.
13. Jerng HH, Pfaffinger PJ, Covarrubias M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 2004;27:343–369.
14. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010;9:776–785.
15. Irani SR, Alexander S, Waters P, et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 2010;133:2734–2748.
16. Kim J, Nadal MS, Clemens AM, et al. Kv4 accessory protein DPPX (DPP6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2008;100:1835–1847.
17. Nadal MS, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. Evidence for the presence of a novel Kv4-mediated A-type K(+) channel-modifying factor. *J Physiol* 2001;537:801–809.
18. Wada K, Yokotani N, Hunter C, et al. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:197–201.
19. Nadal MS, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX. *Brain Res* 2006;1094:1–12.
20. Kaulin YA, De Santiago-Castillo JA, Rocha CA, et al. The dipeptidyl-peptidase-like protein DPP6 determines the unitary conductance of neuronal Kv4.2 channels. *J Neurosci* 2009;29:3242–3251.
21. Singh B, Ogiwara I, Kaneda M, et al. A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2006;24:245–253.

Article 4

Analysis of antibodies to surface epitops of contactin-2 in multiple sclerosis.

Boronat A, Sepúlveda M, Llufrí S, Sabater L, Blanco Y, Gabilondo I, Solà N, Villoslada P, Dalmau J, Graus F, Saiz, A.

J.Neuroimmunology 2012; 244(1-2):103-6



Short communication

Analysis of antibodies to surface epitopes of contactin-2 in multiple sclerosis

Anna Boronat ^a, María Sepúlveda ^a, Sara Llufrí ^a, Lidia Sabater ^a, Yolanda Blanco ^a, Iñigo Gabilondo ^a, Nuria Solà ^a, Pablo Villoslada ^a, Josep Dalmau ^{b,c}, Francesc Graus ^a, Albert Saiz ^{a,*}

^a Center for Neuroimmunology, Service of Neurology, Hospital Clinic and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Institut Català de Recerca i Estudis Avançats (ICREA) at Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Service of Neurology, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Department of Neurology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2011

Received in revised form 16 November 2011

Accepted 16 December 2011

Keywords:

Multiple sclerosis

Contactin-2

Autoantibody

Cell-based assay

Magnetic resonance imaging

ABSTRACT

Contactin-2 was recently identified as an autoantigen targeted by T-cells and autoantibodies in multiple sclerosis (MS). Here we analyzed the frequency of antibodies to contactin-2 (contactin-2-ab) by a cell-based assay in the serum from 105 MS patients and at least 5 years of follow-up (19 clinically isolated syndromes, 51 relapsing-remitting, 20 secondary-progressive, and 15 primary-progressive). Contactin-2-ab were detected in 4 (7.8%) relapsing-remitting patients. Clinical and magnetic resonance imaging characteristics were not significantly different from the rest of relapsing-remitting patients. In conclusion, contactin-2-ab are identified in a minority of MS patients but their presence is not associated with a particular clinical-radiological profile.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS) with both clinical and pathological heterogeneity. In the past few years, the concept of disease suggesting that T-cell-mediated immunity is sufficient for full expression of MS has been challenged, and it is now evident that B cells and humoral immune mechanisms also play key roles (Lassmann et al., 2007; Breij et al., 2008; Franciotta et al., 2008; Hauser et al., 2008; Weiner, 2009).

Pathological studies suggest that antibodies might contribute to plaque initiation and ongoing demyelination in MS patients with established disease (Breij et al., 2008). Although a wide range of candidate antigens and autoantibodies have been reported, the true relevance remains uncertain (Reindl et al., 2006; Racke, 2008). Recently, contactin-2 (and its rodent orthologue, transiently expressed axonal glycoprotein 1, TAG-1), expressed in the juxtaparanodal region of myelinated axons, was identified as an autoantigen targeted by T-cells and autoantibodies. Passive transfer of contactin-2-specific T-cells induced an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) with preferential inflammation of gray matter (Derfuss et al., 2009). In that study, only a minority of antibodies to contactin-2 (contactin-2-ab) bound to the surface of the protein, a prerequisite to mediate a pathological effect, and a clinical-immunological correlation was not done. The aim of the present study was to analyze the frequency and clinical

significance of antibodies to surface epitopes of contactin-2 using a sensitive cell-based assay in a larger series of patients with MS.

2. Patients and methods

2.1. Patients

We selected serum samples from 105 clinically definite MS patients (Poser et al., 1983), 40 of them with paired serum/CSF samples, and at least 5 years of follow-up [at the time of sample collection the clinical syndromes were as follows: clinically isolated syndrome (19 patients), relapsing-remitting MS (51), secondary-progressive MS (20), and primary progressive MS (15)]. Patients are routinely included in a database and followed every 3–6 months. Information on clinical relapses, disability (EDSS [Expanded Disability Status Scale]) and therapies are registered prospectively as previously reported (Llufrí et al., 2010). Demographics, clinical, and brain magnetic resonance imaging (MRI) characteristics of the patients at the time of sampling were reviewed blinded to the antibody results. As controls, we included serum samples from 20 healthy donors. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic and an informed consent was previously obtained.

2.2. Cell-based assay

The presence of contactin-2-ab was analyzed by indirect immunofluorescence on HEK293 cells transfected with a plasmid containing human contactin-2 cDNA clone (*Homo sapiens* contactin 2, axonal,

* Corresponding author at: Servei de Neurologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. Tel.: +34 932275414; fax: +34 932275783.

E-mail address: asaiz@clinic.ub.es (A. Saiz).

CNTN2, SC303578, Origene Technologies, Rockville, MD 20850) as previously described (Boronat et al., 2011). Briefly, patients' sera (dilution 1:40) or CSF (dilution 1:2) and commercial rabbit antibody to contactin-2 (dilution 1:20; rabbit polyclonal to TAG-1, ab66252, Abcam, Cambridge, UK) were applied to live cells for 1 h at 37 °C, washed and fixed with 4% paraformaldehyde, followed by anti-human IgG (dilution 1:2000; fluorescein-conjugated goat F(ab')2 fragment to human IgG (Fc), 55184, Cappel, MP Biomedicals, LLC, Solon, OH) and goat anti-rabbit IgG (dilution 1:1000; Alexa Fluor 555 F(ab')2 fragment of goat anti rabbit IgG (H+L), A21430, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) during 1 h at room temperature. Results were photographed under a fluorescence microscope using Zeiss Axiovision software (Zeiss, Thornwood, NY). The results were evaluated by 3 investigators (AB, LS, AS) blinded to the clinical data. Contactin-2-ab-positive samples were evaluated with a similar cell-based assay for the presence of antibodies against proteins associated with contactin-2: leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI1) and contactin associated protein-like 2 (Caspr2) (Lai et al., 2010).

2.3. Statistical analysis

Chi-squared or Fisher exact test were performed to compare categorical variables. Comparisons between continuous variables were performed using *t*-test. Kaplan–Meier analysis was used to estimate cumulative survival probabilities for time to reach an EDSS (Expanded Disability Status Scale) endpoint of 3.0, 4.0 and 6.0. All significant results were set at two-tailed *p*-value < 0.05. All statistical analysis was performed by software SPSS version 18.0.

3. Results

The demographics and clinical characteristics of the patients included in the study are shown in Table 1. Contactin-2-ab were found in the serum of 4 of the 51 (7.8%) relapsing-remitting patients (Fig. 1). The rest of the samples analyzed, including the available CSF of 3 of the positive patients and the control samples, were negative. Positive samples did not present antibodies against LGI1 or Caspr2. The clinical and MRI characteristics of the positive patients were heterogeneous but not significantly different from the rest of relapsing-remitting patients in terms of demographics, relapses, disability and years of follow-up (Table 2). There were also no significant differences in the analyzed MRI characteristics (available at the time of sampling in 37 negative patients and the 4 positive patients) (Table 2). A new serum sample of the 4 positive patients was analyzed after a median follow-up of 9 years (8–14 years), and the antibodies remained positive in all of them. During the follow-up, 1 (25%) of the positive patients and 11 (23.4%) of the negative patients developed the secondary progressive form of the disease (Table 2).

4. Discussion

This study confirms the existence of an autoantibody response to surface epitopes of contactin-2 in a minority of MS patients. The presence of contactin-2-ab was not consistently associated with a particular clinical profile at the time of detection or with a different evolution at long term.

Autoantibody response to contactin-2 was first identified in MS by proteomic approach (Derfuss et al., 2009). Contactin-2-ab were detected by ELISA not only in MS patients but also in patients with other neurological diseases, and healthy controls. However, when antibodies against surface epitopes of contactin-2 were tested on cell lines transfected with contactin-2 by flow cytometry, only 2 of the 25 MS samples were positive (Derfuss et al., 2009), a similar frequency to that found in the current study.

Contactin-2, a cell-adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, exists both as a glycosphosphatidylinositol-linked cell surface isoform and as a released form. At the juxtaparanodal region of myelinated axons it is expressed on the glial membrane and on the axon as a contactin-2/Caspr2 heterodimer (Poliak et al., 2003; Savvaki et al., 2008; Derfuss et al., 2010). In this localization, the intact myelin sheath probably prevents antibodies to gain access to contactin-2 in the juxtaparanodal region. In fact, contactin-2-ab failed to cause any additional damage when injected to experimental animals with EAE induced by transfer of contactin-2-specific T-cells (Derfuss et al., 2009, 2010). Similar results have been observed with antibodies to neurofascin, another recently identified autoantigen in MS (Mathey et al., 2007).

Antibodies to surface epitopes of contactin-2 were recently detected in 5 of the 96 patients who had antibodies previously attributed to voltage-gated potassium channel (VGKC) (Irani et al., 2010). Four of the 5 positive samples also had additional antibodies. Two of them had antibodies to Caspr2, one to LGI1, and one to Kv1.2. These results are not unexpected considering that contactin-2 is in the list of proteins that, like LGI1 and Caspr2, colocalizes or associates with VGKC (Poliak et al., 2003; Savvaki et al., 2008). In contrast, MS patients of the present study only presented contactin-2-ab.

Although contactin-2-ab do not seem to induce neuronal dysfunction of gray matter inflammation (Derfuss et al., 2009), the close association of antibodies against contactin-2-related proteins with disorders characterized by neuronal dysfunction (Lancaster et al., 2011), and the expression of contactin-2 in subsets of cortical neurons (Savvaki et al., 2008) supports the previous observation that contactin-2-specific T-cells could play a pathogenic role in the cortical pathology of MS patients (Derfuss et al., 2009). This pathogenic effect would be relevant because in the progressive forms of the disease, both secondary and primary progressive MS, the cortex is severely affected with extensive cortical demyelination associated with inflammatory infiltrates in the leptomeninges (Lassmann et al., 2007). Moreover, cortical lesions can be present from the onset of the disease, and contribute to physical disability and cognitive impairment (Mike et al., 2011).

Table 1

Demographic and clinical characteristics of the patients included in the study.

	Clinically isolated syndrome (n = 19)	Relapsing-remitting MS (n = 51)	Secondary progressive MS (n = 20)	Primary progressive MS (n = 15)
Gender: female/male	14/4	31/20	13/8	9/5
Age at onset (y); mean ± SD	32 ± 10	31 ± 11	32 ± 11	43 ± 7
Age at sampling (y); mean ± SD	32 ± 10	36 ± 11	41 ± 12	51 ± 6
Disease duration at sampling (y); mean ± SD	0.3 ± 0.4	5.5 ± 6.5	8.9 ± 5.7	7.6 ± 5.3
Disease duration (y); mean ± SD	10.5 ± 2.0	16.1 ± 8.2	18.1 ± 5.7	16.3 ± 6.3
EDSS at sampling; mean ± SD	1.8 ± 1.1	2.2 ± 1.4	5.0 ± 1.6	4.4 ± 1.3
EDSS at last follow-up; mean ± SD	2.1 ± 1.6	3.5 ± 2.1	6.9 ± 1.6	6.1 ± 1.3
Follow-up from sampling (y); mean ± SD	10.2 ± 1.9	10.6 ± 3.1	9.2 ± 3.6	8.7 ± 4.1

y—Years; SD—standard deviation; n—number; EDSS—Expanded Disability Status Scale.

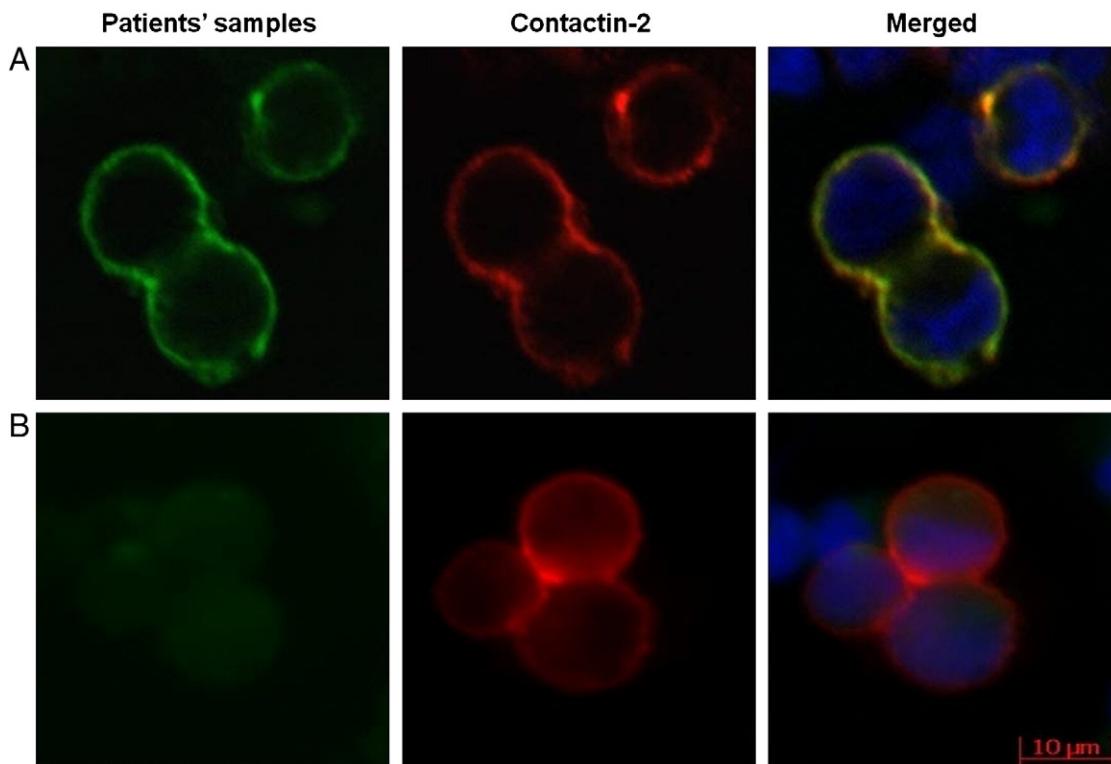


Fig. 1. Detection of antibodies to contactin-2 using a cell-based assay. Binding of antibodies from a positive patient to the surface of HEK293 cells transfected with human contactin-2 cDNA clone (A; green); the cells were coincubated with a rabbit antibody against contactin-2 (A; red); the reactivity of the patient's serum colocalizes with the reactivity of the rabbit antibody specific for contactin-2 (A; merge; yellow); HEK293 transfected cells did not show reactivity with the serum of a healthy control (B).

Finally, in our study contactin-2-ab were only detected in the serum, and it is similar to neuromyelitis optica and NMO-IgG in which the antibodies are less frequently detectable in CSF (Jarius et al., 2010). Although the persistence of contactin-2-ab in all 4 patients after a median follow-up of 9 years would suggest that they are not merely an epiphenomenon, it does not mean that contactin-2-ab are relevant for the disease as is suggested in our study. It is important to note, however, that the lack of significant differences between

contactin-2-ab positive and negative patients could be related to the low number of positive patients. This is in contrast with autoantibodies to MOG in which their detection by cell-based assays seems to identify a subgroup of patients with acute disseminated encephalomyelitis (Di Pauli et al., 2011).

In conclusion, the frequency of contactin-2-ab in MS is low, mostly observed in relapsing forms and, although the antibodies persist for long time, their presence is not associated with a particular clinical-

Table 2
Demographic, clinical and MRI characteristics of relapsing-remitting patients.

	Contactin-2-ab negative (n = 47)	Contactin-2-ab positive (n = 4)	p-Value
Gender: female/male	28/19	3/1	n.s.
Age at onset (y); mean ± SD	30 ± 11	33 ± 3	n.s.
Age at sampling (y); mean ± SD	36 ± 11	39 ± 7	n.s.
Disease duration at sampling (y); mean ± SD	5.4 ± 6.4	6.6 ± 9.1	n.s.
Disease duration (y); mean ± SD	16.1 ± 8.0	16.5 ± 11.8	n.s.
n relapses first 2 y; mean ± SD	2.3 ± 1.5	2.0 ± 0.8	n.s.
n relapses first 5 y; mean ± SD	4.6 ± 3.6	3.8 ± 2.2	n.s.
Annualized relapse rate; mean ± SD	0.56 ± 0.35	0.43 ± 0.24	n.s.
EDSS at sampling; mean ± SD	2.2 ± 1.4	2.0 ± 1.9	n.s.
EDSS at last follow-up; mean ± SD	3.5 ± 2.1	4.4 ± 3.1	n.s.
Time to EDSS 3.0 (y); mean (95% CI)	18.2 (14.8–21.7)	10.2 (3.82–16.7)	n.s.
Time to EDSS 4.0 (y); mean (95% CI)	21.2 (17.7–24.6)	14.5 (6.1–22.9)	n.s.
Time to EDSS 6.0 (y); mean (95% CI)	26.6 (23.1–30.2)	22	n.s.
Develop of SPMS; n (%)	11 (23.4)	1 (25)	n.s.
Time to SPMS (y); mean ± SD	18.6 ± 9	23	n.s.
Follow-up from sampling (y); mean ± SD	10.6 ± 3.2	9.9 ± 2.8	n.s.
Brain MRI at sampling (n):	37	4	n.s.
n Of T2 lesions; mean ± SD	22.37 ± 17.9	17.67 ± 16.2	n.s.
n Of periventricular lesions; mean ± SD	7.7 ± 5.4	5 ± 3.6	n.s.
n Of juxtacortical lesions; mean ± SD	4.43 ± 5.2	2 ± 2	n.s.
n Of infratentorial lesions; mean ± SD	1.9 ± 2.7	3.25 ± 3.3	n.s.
n Of cortical lesions; mean ± SD	0.17 ± 0.38	0.25 ± 0.5	n.s.
n Of enhancing lesions; mean ± SD	6.9 ± 16.6	1.0 ± 0	n.s.

Contactin-2-ab—antibodies to contactin-2; y—years; SD—standard deviation; n—number; EDSS—Expanded Disability Status Scale; SPMS—secondary progressive multiple sclerosis; CI—confidence interval; MRI: magnetic resonance images.

radiological profile. Our results would suggest that contactin-2-ab analysis would not be useful for identifying different disease subtypes or prognosis.

Acknowledgements

Supported in part by grant PS09/0193 Fondo de Investigaciones Sanitarias, Madrid, Spain (FG), and Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM) RD07/0060/0001 (PV), RD07/0060/0012 (FG). Dr. Dalmau receives royalties from the editorial board of Up-To-Date, and from patents for the use of Ma2 and NMDAR as autoantibody test. Dr. Dalmau has received a research grant from Euroimmun, and his contribution to the current work was supported in part by grants from the National Institutes of Health RO1NS077851, RO1MH094741, the National Cancer Institute RO1CA89054, Fundació la Marató de TV3, and a McKnight Neuroscience of Brain Disorders award.

References

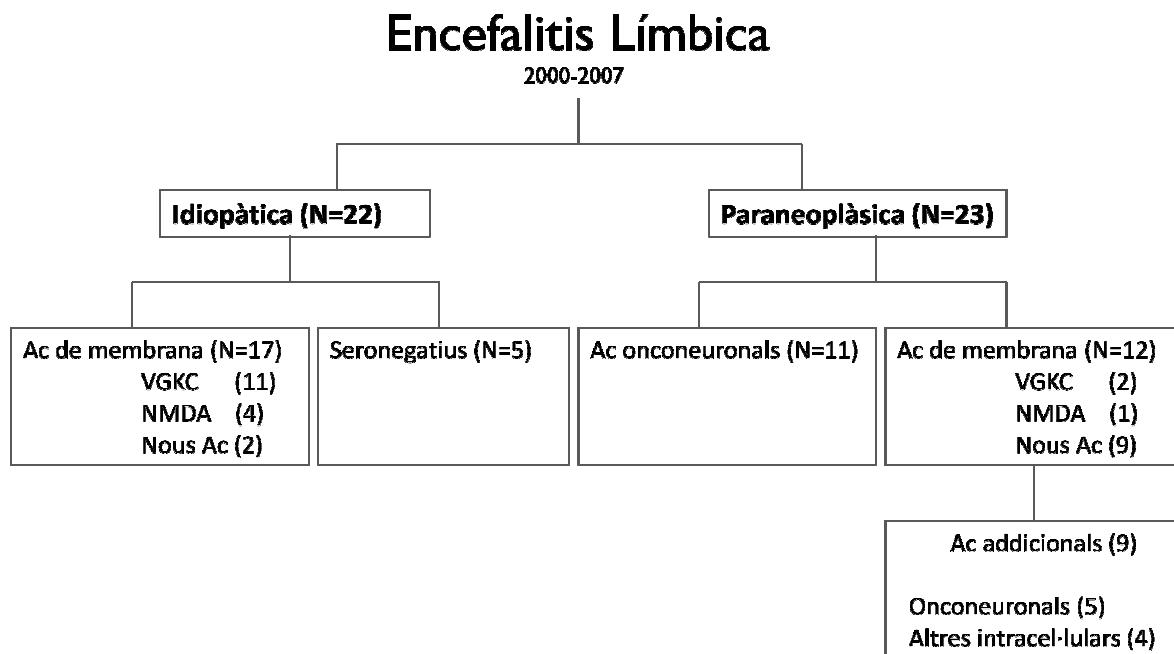
- Boronat, A., Sabater, L., Saiz, A., Dalmau, J., Graus, F., 2011. GABA_B receptor antibodies in limbic encephalitis and anti-GAD-associated neurologic disorders. *Neurology* 76, 795–800.
- Breij, E.C.W., Brink, B.P., Veerhuis, R., van den Berg, C., Vloet, R., Yan, R., Dijkstra, C.D., van der Valk, P.Bo, L., 2008. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 63, 16–25.
- Derfuss, T., Parikh, K., Velhin, S., Braun, M., Mathey, E., Krumbholz, M., Kümpfel, T., Moldenhauer, A., Rader, C., Sondergaard, P., Pöllmann, W., Tiefenthaler, C., Bauer, J., Lassmann, H., Wekerle, H., Karagogeos, D., Hohlfeld, R., Linington, C., 2009. Contactin-2/TAG-1 directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8302–8307.
- Derfuss, T., Linington, C., Hohlfeld, R., Meinl, E., 2010. Axo-glial antigens as targets in multiple sclerosis: implications for axonal and grey matter injury. *J. Mol. Med.* 88, 753–761.
- Di Pauli, F., Mader, S., Rostasy, K., Schanda, K., Bajer-Kornek, B., Ehling, R., Deisenhammer, F., Reindl, M., Berger, T., 2011. Temporal dynamics of anti-MOG antibodies in CNS demyelinating diseases. *Clin. Immunol.* 38, 247–254.
- Franciotta, D., Salvetti, M., Lollis, F., Serafini, B., Aloisi, F., 2008. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 7, 852–858.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, L.D., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzica, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C.H., for the HERMES Trial Group, 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 676–688.
- Irani, R.S., Alexander, S., Waters, P., Kleopa, K.A., Pettingill, P., Zuliani, L., Peles, E., Buckley, C., Lang, B., Vincent, A., 2010. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133, 2734–2748.
- Jarius, S., Franciotta, D., Paul, E., Ruprecht, K., Bergamaschi, R., Rommer, P.S., Reuss, R., Probst, C., Kristoferitsch, W., Wandinger, K.P., Wildemann, B., 2010. Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *J. Neuroinflammation* 7, 1057–1065.
- Lai, M., Huijbers, M.G.M., Lancaster, E., Graus, F., Battaller, L., Balice-Gordon, R., Cowell, J.K., Dalmau, J., 2010. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol.* 9, 776–785.
- Lancaster, E., Martínez-Hernández, E., Dalmau, J., 2011. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology* 77, 179–189.
- Lassmann, H., Brück, W., Luchinetti, C.F., 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 17, 210–218.
- Llufrí, S., Pujol, T., Blanco, Y., Hankiewicz, K., Squarcia, M., Berenguer, J., Villoslada, P., Graus, F., Saiz, A., 2010. T2 hypointense rims and ring-enhancing lesions in MS. *Mult. Scler.* 16, 1317–1325.
- Mathey, E.K., Derfuss, T., Storch, M.K., Williams, K.R., Hales, K., Woolley, D.R., Al-Hayani, A., Davies, S.N., Rasband, M.N., Olsson, T., Moldenhauer, A., Velhin, S., Hohlfeld, R., Meinl, E., Linington, C., 2007. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J. Exp. Med.* 204, 2363–2372.
- Mike, A., Glanz, B.I., Hildenbrand, P., Meier, D., Bolden, K., Liguori, M., Dell'Osso, E., Healy, B.C., Bakshi, R., Guttman, C.R.G., 2011. Identification and clinical impact of multiple sclerosis cortical lesions assessed by routine 3T MR imaging. *Am. J. Neuroradiol.* 32, 515–521.
- Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pavny, L., Stewart, C.L., Xu, X., Chiu, S.Y., Shrager, P., Furley, A.J., Peles, E., 2003. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J. Cell. Biol.* 162, 1149–1160.
- Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., Johnson, K.P., Sibley, W.A., Silberberg, D.H., Tourtellotte, W.W., 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* 13, 227–231.
- Racke, M.K., 2008. The role of B cells in multiple sclerosis: rationale for B-cell-targeted therapies. *Curr. Opin. Neurol.* 21 (Suppl. 1), S9–S18.
- Reindl, M., Khalil, M., Berger, T., 2006. Antibodies as biological markers for pathophysiological processes in MS. *J. Neuroimmunol.* 180, 50–62.
- Savvaki, M., Panagiotaropoulos, T., Stamatakis, A., Sargiannidou, I., Karatzoulia, P., Watanabe, K., Stylianopoulou, F., Karagogeos, D., Kleopa, K.A., 2008. Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Mol. Cell. Neurosci.* 39, 478–490.
- Weiner, H.L., 2009. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann. Neurol.* 65, 39–248.

IV. RESULTATS I

DISCUSSIÓ

Resultats i discussió de les publicacions

Inicialment s'havia descrit el perfil clínic d'un grup concret de malalts amb ELP i Acs contra diferents proteïnes onconeuronals, en el que gairebé la meitat d'aquests pacients tenien CPCP i els Acs s'associaven principalment a l'Ag Hu, i en menor freqüència a l'amfifisina i CV2, però encara quedava més d'un 50% d'aquests malalts, amb afectació preferentment al sistema límbic i una resposta favorable al tractament amb immunosupressors, considerats “seronegatius” perquè no se’ls hi havia detectat cap Ac onconeural associat (Alamowitch et al., 1997). Amb el nou grup d'Acs dirigits contra Ags de membrana, aquell grup de malalts amb encefalitis considerats “seronegatius” començava a definir-se, un estudi retrospectiu (en el que es van avaluar els casos de diverses EL compreses entre els anys 2000 i 2007) realitzat per Graus i els seus col·laboradors (**Figura 8**) indicava que aproximadament la meitat de les EL que havien estudiat eren paraneoplàsiques, d'aquestes el 47% (11 de 23) presentaven Acs onconeuronals, mentre que el 52% (12 de 23) tenien Acs de membrana, i d'aquests el 75% presentaven Acs contra Ags de membrana encara no identificats. I respecte el grup de malalts amb EL idiopàtica, un 11% (2 de 17) també presentaven Acs contra nous Ags de membrana (Graus et al., 2008). Una part dels estudis realitzats en la present tesi es centren en caracteritzar aquest 75% i 11% de malalts que presenten Acs de membrana contra Ags desconeguts.

Figura 8

Graus et al. Neurology 2008; 71(12):930-6

En total des del 2007 s'han anat identificant 7 autoanticossos de membrana: els anti-R-NMDA, anti-R-AMPA, anti-R-GABA_B, anti-LGII, anti-Caspr2, anti-R-Glicina i anti-mGluR5. Totes aquestes dianes antigèniques estan implicades en la transmissió sinàptica i la plasticitat, o excitabilitat nerviosa, i tot i que les síndromes associades a aquests autoantígens són síndromes severes, que afecten a la memòria, comportament, cognició, i molts cops donen alteracions psiquiàtriques, el tractament amb immunoteràpia acostuma a ser efectiu (Ances et al., 2005), (Rosenfeld and Dalmau, 2010). La freqüència d'aquestes síndromes, tenint en compte que fins fa poc no es coneixien, és relativament alta, especialment en el cas del R-NMDA, on la freqüència supera les encefalitis víriques si contéssim cada soca viral per separat (Strader et al., 2006), i de fet estudis recents demostren que diversos casos d'encefalitis de nens i adults podrien estar causats per una disfunció autoimmune, conseqüència de l'acció patogènica dels Acs contra proteïnes de superfície involucrades en les sinapsis neuronals del SNC (Graus et al., 2010), (Dalmau et al., 2008), (Lai et al., 2009) (Lancaster et al., 2010), (Lai et al., 2010), (Lancaster et al., 2011).

Els resultats obtinguts en aquesta tesi han donat lloc a la publicació de 4 articles, amb els quals hem contribuït a identificar un nou autoanticòs, i a caracteritzar el perfil clínic, la freqüència, i la co-expressió amb els Acs onconeuronals de les encefalitis associades a Ags de membrana. I hem estudiat la freqüència d'expressió d'un autoantígen de membrana que interacciona amb el complex dels VGKC en el perfil de l'EM.

ANTICOSSOS CONTRA EL RECEPTOR GABA_B EN L'ENCEFALITIS LÍMBICA I ALTRES SÍNDROMES NEUROLÒGIQUES ASSOCIADES A ANTICOSSOS ANTI-GAD.

Anteriorment s'havia descrit la presència d'Acs contra el R-GABA_B en pacients amb EL associada a CPCP o simultàniament amb Acs anti-GAD, i amb aquest estudi volíem analitzar la freqüència de pacients que tenien Acs anti-R-GABA_B en aquests dos perfils clínics, contribuint així a la caracterització de la reactivitat dels Acs associats a aquest receptor.

Vam analitzar un total de 147 pacients: 70 tenien EL (51 paraneoplàsica, i 19 idiopàtica), i 77 tenien altres síndromes associades a Acs anti-GAD (29 síndrome de la persona rígida, 28 atàxia cerebel·lar, 14 epilepsia, i 6 eren paraneoplàsics) (**Taula 5**). Dels 147 pacients, 11 van resultar positius per aquest autoantigen, i els vam detectar preferentment en malats amb EL. El 14% dels pacients amb EL (10 dels 70) tenien Acs contra el R-GABA_B i el 80% (8 dels 10 pacients) tenien CPCP, mentre que els 2 restants eren idiopàtics. Aquests resultats indiquen que els Acs anti-R-GABA_B són més freqüents en els casos amb ELP (8 dels 51) respecte els casos d'EL idiopàtica (2 de 19). I dins el grup d'ELP els esperarem trobar sense Acs onconeuronals clàssics associats (tan sols 1 presentava a més Acs contra IAg Hu i tenia CPCP).

9 dels 10 pacients amb Acs contra el R-GABA_B i EL eren homes, d'uns 60 anys de mitjana d'edat, i tots presentaven confusió, desorientació, pèrdua de memòria, canvis de comportament, i encefalitis preferentment associada a alteracions en el sistema límbic. 8 d'ells a més havien presentat convulsions importants en algun moment (2 van

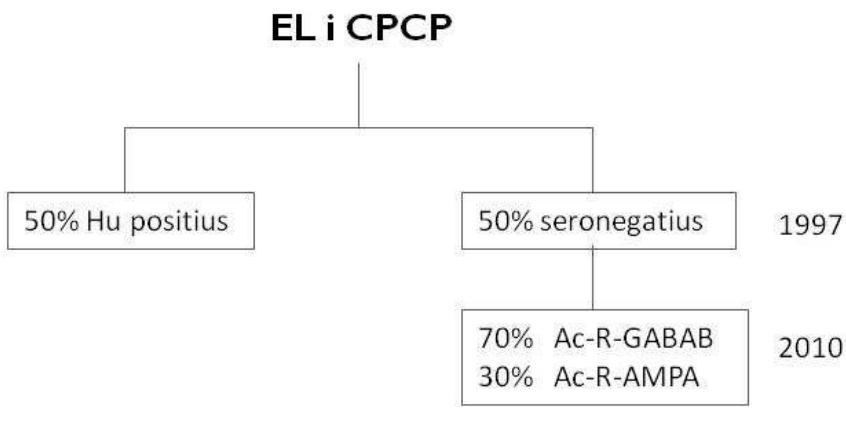
requerir entrar a la unitat de cures intensives per controlar les convulsions), i el LCR mostrava pleocitosis de limfòcits en 4 pacients i la ressonància magnètica mostrava un augment del fluid.

Respecte el grup de malats amb malalties associades a Acs anti-GAD, no vam trobar Acs contra el R-GABA_B en cap dels pacients GAD-positius i la síndrome de la persona rígida, atàxia cerebel·lar o epilèpsia. Només 1 dels pacients amb Acs anti-GAD i timoma presentava també Acs contra el R-GABA_B (**Taula 5**).

Taula 5. Freqüència d'anticossos anti-receptor GABA_B en 147 pacients amb encefalitis, o síndromes neurològiques associades a anticossos anti-GAD.

Síndrome	Nº pacients	Acs-R-GABA _B (%)
Encefalitis límbica	70	10 (14%)
ELP	51	8 (16%)
Amb Acs-onconeuronals	33	1 (3%)
Sense Acs onconeuronals	18	7 (39%)
EL idiopàtica	19	2 (14%)
Síndromes associades a Acs-anti-GAD	77	1 (1%)
Síndrome de la persona rígida	29	0 (0%)
Atàxia cerebel·lar	28	0 (0%)
Epilèpsia	14	0 (0%)
Paraneoplàsica	6	1 (17%)

Paral·lelament als objectius d'aquest estudi, amb els nostres resultats també vam contribuir a caracteritzar el grup de malats amb EL i CPCP definits com a seronegatius al 2007 (comentats anteriorment en la figura 8), dels quals el 70% tenen Acs contra el R-GABA_B i el 30% restant Acs contra el R-AMPA. En la **Figura 9** es reflexa l'evolució dels avanços en la caracterització d'aquesta síndrome.

Figura 9Alamowitch et al. *Brain* 1997Boronat et al. *Neurology* 2011

Els resultats no suggereixen associació entre els Acs contra el receptor de GABA_B i contra el GAD. Dels 107 pacients, només 3 malalts tenien els dos Acs, dels quals 2 tenien ELP sense Acs onconeuronals associats, i el tercer tenia atàxia cerebel·lar paraneoplàsica. Tots tres tenien un tumor, els 2 amb EL tenien CPCP, i el de l'ataxia cerebel·lar paraneoplàsica tenia un timoma. Dels pacients dels quals disposàvem de sèrum i LCR (5 en total) vam analitzar els dos tipus de mostres, i ambdós eren positives.

En l'estudi inicial del GABA_B, d'una sèrie de 15 pacients amb ELP o idiopàtica, 13 tenien convulsions, 12 tenien algun càncer relacionat amb els pulmons, dels quals 5 tenien CPCP, i 3 a més tenien Acs anti-GAD (Lancaster et al., 2010). Amb el nostre estudi, vam contribuir a la caracterització d'aquest nou autoanticòs incrementant el nombre de malalts analitzats, i en contra del que aparentment suggerien els resultats anteriors, els nostres resultats indiquen que no és molt freqüent en aquells pacients trobar simultàniament els dos autoanticossos, en el nostre estudi tan sols dos malalts amb EL tenien Acs contra el R-GABA_B i contra el GAD, i els dos tenien CPCP. Altres estudis suggereixen que els pacients amb ELP associada a Ags de membrana poden tenir també Acs contra Ags intracel·lulars clàssics, i en aquests casos, el tractament amb immunoteràpia no és tant efectiu. (Graus et al., 2008). Per contra, en el nostre estudi

del grup dels 33 pacients amb ELP i Acs onconeuronals només 1 malalt tenia Acs onconeuronals addicionals, i era contra la proteïna Hu.

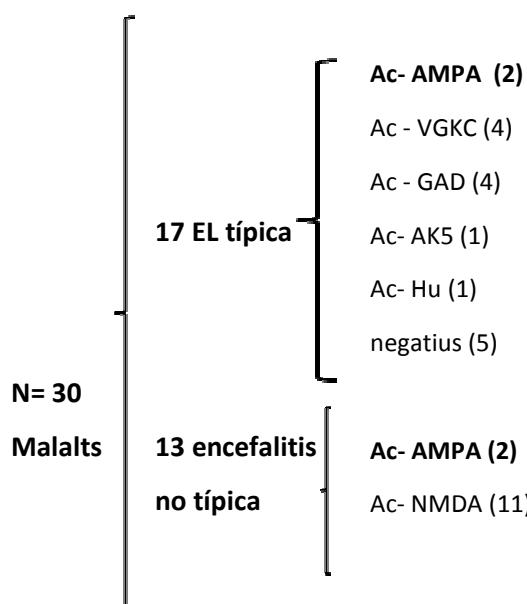
Per un altre costat, diversos estudis demostren l'associació entre els Acs anti-GAD, l'epilèpsia i l'atàxia cerebel·lar (Vulliemoz et al., 2009), i en l'estudi realitzat pel grup de Dalmau, 13 dels 15 pacients descrits tenien convulsions. En conseqüència, quan vam seleccionar el grup de pacients a estudiar, vam incloure un grup de malalts amb altres síndromes, que per la clínica de les convulsions i la possible associació amb els Acs anti-GAD podien ser susceptibles a tenir també Acs anti-R-GABA_B. Però els nostres resultats indiquen que tampoc hi ha una associació entre la presència d'Acs anti-R-GABA_B i Acs anti-GAD, només els vam detectar en un pacient amb atàxia cerebel·lar, i era en un context paraneoplàsic.

Pel que fa a la clínica d'aquests malalts, una possible explicació podria ser el rol patogènic d'aquests Acs de membrana, els receptors del GABA_B es concentren en l'hipocamp, tàlam i cerebel, i les disfuncions neurològiques es correlacionen bastant amb el lloc on s'expressa l'Ag, en aquets cas, una clínica associada a la disfunció de l'hipocamp i cerebel preferentment, tot i que caldria fer estudis similars als realitzats amb els Acs anti-R-NMDA per veure si els receptors s'internalitzen per causa directa dels Acs (Dalmau et al., 2008). Respecte el perfil clínic d'aquests pacients no és substancialment diferent de la resta d'EL autoimmunes. I tot i l'elevada freqüència de convulsions en aquests pacients, no és predictiu d'autoimmunitat associada als Acs anti-R-GABA_B, ja que quasi el 50% dels malalts amb encefalitis pateixen convulsions, i la majoria de malalts amb Acs anti-GAD també en tenen (Saiz et al., 2008), (Gultekin et al., 2000), (Malter et al., 2010).

PERFIL CLÍNIC DE L'ENCEFALITIS ASSOCIADA A ANTICOSSOS CONTRA EL RECEPTOR AMPA.

Un altre estudi que vam realitzar tenia l'objectiu de caracteritzar el perfil clínic dels malalts amb Acs contra el receptor de l'AMPA. Vam analitzar el sèrum o LCR de 30 malalts: 17 tenien EL típica, i 13 tenien quadres d'encefalitis que no complien tots els criteris per ser considerats EL (**Taula 6**). Dels 17 malalts amb EL típica, 2 tenien Acs contra el R-AMPA, i la resta tenien Acs contra els VGKC (4), GAD (4), AK5 (1), Hu (1), i 5 no tenien Acs. I dels 13 que no complien estrictament els criteris d'encefalitis, 2 malalts també presentaven Acs anti-R-AMPA (els altres 11 tenien Acs anti-R-NMDA). En total, 4 dels 30 pacients (13%) tenien Acs contra aquest receptor, tots eren dones, d'entre 51 i 71 anys, i en una d'elles els Acs es van detectar només en el LCR.

Taula 6.



En un estudi realitzat amb 109 pacients es van detectar Acs contra el receptor de l'AMPA en 10 malalts amb EL, un 9% (Lai et al., 2009), similar als nostres resultats, amb el nostre estudi nosaltres hem detectat Acs anti-R-AMPA en 2 malalts amb un quadre d'EL típica i en 2 malalts amb un perfil de canvis ràpids i progressius de comportament que recordaven una psicosi. Igual com s'ha vist amb alguns receptors de membrana, l'absència d'Acs en el sèrum no exclou que n'hi hagi en el LCR, en el nostre estudi en una de les malalties només vam detectar els Acs en el LCR, fet que també ha estat descrit anteriorment amb els Acs anti-R-NMDA, on s'ha vist que la concentració d'Acs en el sèrum és menor, i en casos de títols baixos, pot ser que només es detectin en el LCR (Dalmau et al., 2008). Per un altre costat els nostres resultats indicaven, que els Acs anti-R-AMPA també es poden detectar per immunohistoquímica sobre teixit de rata perfós amb paraformaldehid, que és la manera habitual de processar el teixit per detectar els Acs onconeuronals en els laboratoris de referència (Vincent et al., 1998).

Pel que fa al perfil clínic, els nostres resultats indiquen que els Acs anti-R-AMPA s'associen a dones majors de 50 anys, amb una simptomatologia típica d'EL o també en pacients que es presentin amb canvis ràpids i progressius de comportament que recorden una psicosis aguda. Aquesta clínica es podria correlacionar amb la distribució que té el R-AMPA en el cervell, que s'expressa preferentment en l'hipocamp, córtex cerebel·lar, gànglia basal, i cerebel (Sprengel, 2006). Una altra dada interessant és que només el 20% dels càncers de pulmó són de cèl·lula petita, i 2 dels 4 pacients amb Acs contra el R-AMPA presentaven ELP associada a CPCP, i afortunadament ambdós van respondre al tractament amb quimioteràpia i esteroides.

ENCEFALITIS I ANTICOSSOS CONTRA EL DPPX, UNA PROTEÏNA ASSOCIADA A LA SUBUNITAT KV4.2 DELS CANALS DE POTASSI.

En la present tesi també hem realitzat un altre tipus d'estudi enfocat a identificar nous Ags de membrana implicats en la patofisiologia de les encefalitis, i amb aquest treball vam descriure una nova síndrome autoimmuna associada a la presència d'Acs anti-

DPPX, una proteïna del complex dels canals de potassi 4.2, els resultats del qual han donat lloc a la publicació d'un article.

Vam identificar, per immunoprecipitació, espectrometria de masses i posterior immunoblot, un nou autoanticòs associat a l'encefalitis, i posteriorment vam detectar-lo en tres malalts més, el sèrum dels quals tenia una reactivitat contra el neuròpil de l'hipocamp similar a la mostra de sèrum que havíem immunoprecipitat inicialment. En total vam detectar Acs contra el DPPX en 4 malalts, (2 homes i 2 dones, d'edat entre 45-76 anys) que van desenvolupar una ràpida i progressiva encefalopatia caracteritzada per agitació, disfunció cognitiva, confusió, deliris paranoics, al·lucinacions visuals, tremolars i sacsejades mioclòniques, i en 3 d'ells els símptomes neurològics anaven acompanyats o precedits de diarrea abundant d'etologia desconeguda i una pèrdua important de pes. El sèrum dels 4 pacients va mostrar reactivitat contra els epítops extracel·lulars del DPPX, i tots reaccionaven contra les dues isoformes de la molècula (DPPX-L i DPPX-S, que varien en la llargada del domini citoplasmàtic). Dos pacients tenien a més Acs contra epítops intracel·lulars, ja que mostraven reactivitat contra les cèl·lules HEK transfectades amb un plàsmid que codificava per la molècula DPPX modificada a la que se li havia eliminat la part extracel·lular del C-terminal, i un altre malalt a més presentava també un Ac addicional no caracteritzat, que immunoreaccionava sobre teixit de ratolí deficient en aquesta proteïna donant un patró immunohistoquímic característic, diferent al patró que donen els Acs anti-DPPX. Per contra, cap d'ells va reaccionar contra el DPPI0, ni contra el KV4.2. I per un altre costat, l'anàlisi immunohistoquímica de l'intestí prim va demostrar que el DPPX s'expressa en les neurones del plexe mientèric, i en aquest cas, els Acs també hi reaccionen.

L'anàlisi del LCR d'aquests pacients mostrava pleocitosi, i increment d'IgG o bandes oligoclonals, però finalment amb la immunoteràpia persistent o intensiva, els símptomes neurològics van millorar notablement, tot i que de manera lenta (< 1 any), i associada a recaigudes al retirar o disminuir la immunoteràpia.

Els quatre pacients que descrivim presenten Acs contra el DPPX, una molècula que està funcionalment relacionada amb els VGKC (retorna el canal a les seves condicions basals), concretament amb la subunitat KV4.2, que és dependent de dues subunitats auxiliars, la proteïna intracel·lular KChIP (*intracellular Kv-channel-interacting protein*) i

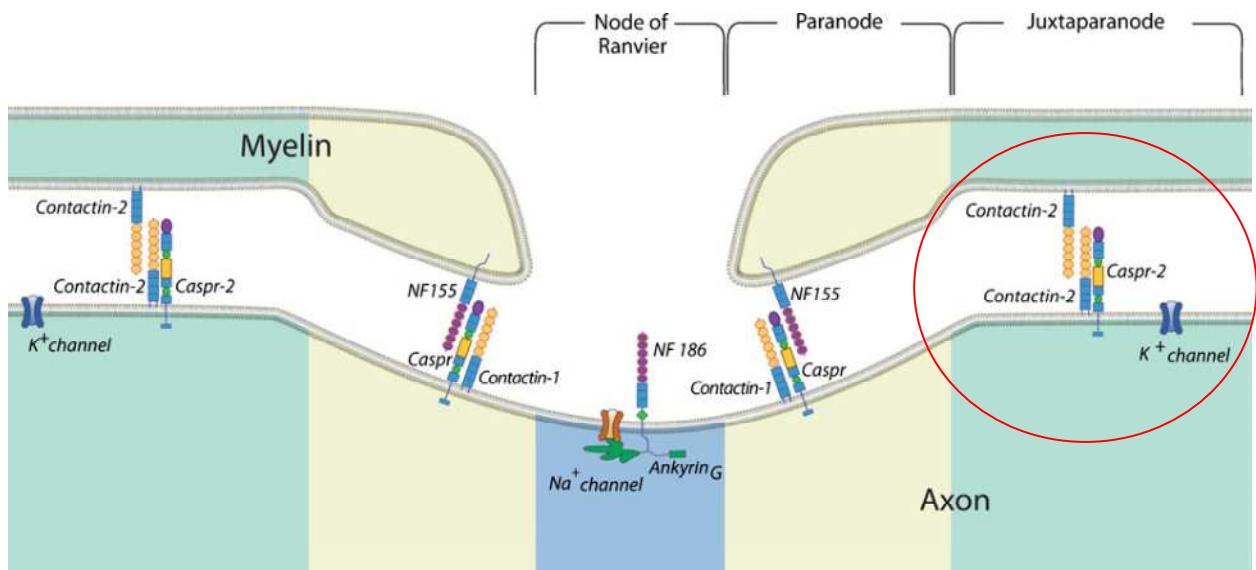
l'extracel·lular DPPX, preferentment expressada en les neurones piramidals de l'hipocamp i cerebel) (Seikel and Trimmer, 2009), (Nadal et al., 2001). Per diverses tècniques hem demostrat que aquesta autoreactivitat és específica contra el DPPX, el sèrum dels quatre malalts no van reaccionar ni contra els KV4.2 ni contra la KChIP, ni tampoc contra el DPP10, una molècula de la mateixa família que el DPPX amb la que té una elevada homologia. Els resultats suggereixen que aquesta síndrome és d'etologia immunomediada, el fet que els 4 pacients reaccionin contra epítops extracel·lulars i que el seu LCR mostri pleocitosi donen suport a aquesta hipòtesi.

Pel que fa a la simptomatologia d'aquests pacients, els principals símptomes (que inclouen agitació, mioclonus, tremolors i convulsions) no són característics d'una síndrome concreta i són compatibles amb altres síndromes com la hiperexcitabilitat neuronal, però els ratolins deficientis en aquesta molècula mostren un increment de l'excitabilitat en els estudis electrofisiològics (Kaulin et al., 2009), i una publicació del 2006 descriu el cas d'un pacient en el que es suggereix que la mutació de la molècula Kv4.2 li va provocar alteracions en el lòbul temporal desencadenant epilepsia, que resulta en una excitabilitat aberrant de l'expressió del canal mutat en les cèl·lules (Singh et al., 2006). Però la implicació pràctica d'aquest estudi és que la diarrea, l'encefalitis amb signes d'hiperexcitabilitat i la pleocitosi del LCR són característiques que ens permetran reconèixer nous casos, i malgrat encara se'n desconeui la freqüència i el seguiment de tres dels malalts ens indiqui que és una síndrome severa, aquests pacients responen al tractament amb immunoteràpia. Per un altre costat, l'anàlisi immunohistoquímica de l'intestí prim va demostrar que el DPPX s'expressa en les neurones del plexe mientèric, i els Acs també reaccionen contra el DPPX expressat en aquestes neurones. Una possible explicació sobre l'associació de la diarrea i els Acs anti-DPPX podria ser el resultat d'un mimetisme molecular relacionat amb la infeció d'algun agent infeccios encara desconegut, similar a la que succeeix amb la síndrome de Guillain-Barré i les infeccions per *Campylobacter jejuni* (Talukder et al., 2011).

ANÀLISI DELS ANTICOSSOS CONTRA EPÍTOPS DE SUPERFICIE DE LA CONTACTINA-2 EN L'ESCLEROSI MÚLTIPLE

Fins fa poc MOG era l'únic autoantigen que es coneixia que podia tenir una acció patogènica, induint l'activació d'una resposta immunològica desencadenada per les cèl·lules T i alhora promoure un atac dels Acs provocant desmielinització en els models animals, però recentment s'ha demostrat que Kir 4.1 també és un autoantigen potencialment patogènic. Això suggereix que poden haver-hi altres autoanticossos dirigits contra altres molècules del SNC potencialment patogèniques que podrien produir o contribuir a desencadenar el dany en els malalts amb EM. La contactina-2 és una proteïna, que igual que Kir4.1, està relacionada amb els VGKC, i contra la qual alguns pacients amb EM presenten reactivitat, a més, interacciona amb Caspr2 (**Figura 10**), un autoantigen d'alguns malalts amb EL o neuromiotonia. Amb l'objectiu de contribuir a caracteritzar els diferents perfils dels malalts amb EM, en aquest treball vam estudiar la freqüència i patogenicitat dels Acs anti-contactina-2 en pacients amb EM.

Figura 10. Esquema d'un nòdul de Ranvier.



Modificació de la imatge extreta de: Derfuss et al. J.Mol Med 2010; 88(8):753-61

Vam analitzar la presència d'Acs anti-contactina-2 en el sèrum de 105 pacients clínicament definits com EM. D'aquests pacients: 19 tenien síndrome clínicament aïllada, 51 tenien EM remitent-recurrent, 20 la forma secundàriament progressiva, i 15 EM primàriament progressiva. I en 40 dels 105 pacients a més del sèrum se'ls hi havia extret LCR, el qual també vam estudiar. En total vam detectar Acs anti-contactina-2 en el sèrum de 4 pacients en fase remitent-recurrent, i el seguiment dels pacients durant 8-14 anys indicava que els Acs de tots ells persistien en el sèrum dels malalts al llarg del temps. Per contra, cap d'ells presentava una reactivitat addicional contra el Caspr2 o el LGII.

Les ressonàncies magnètiques d'aquests pacients eren heterogènies però no significativament diferents de la resta de malalts en fase remitent-recurrent, no eren diferents ni en el nombre total de lesions en T2, ni en el nombre de lesions periventriculars, ni juxtacorticals. Durant el seguiment dels pacients, 1 (25%) dels positius i 11 (23.4%) dels negatius, van passar a una fase secundaria progressiva de la malaltia.

Els nostres resultats indiquen que el 7.8% dels malalts amb EM en fase remitent-recurrent tenen Acs anti-contactina-2, fet que confirma els resultats de Derfuss sobre l'existència d'Acs anti-contactina-2 en malalts amb EM (Derfuss et al., 2009). I similar al que passa en la neuromielitis òptica i els Acs anti-aquaporina4, els Acs es detecten pitjor en el LCR que en el sèrum (Jarius et al., 2010), de fet en el nostre estudi amb la contactina-2 només els vam detectar en el sèrum d'aquests malalts, no en el LCR. I tot i que els Acs persisteixin en el sèrum dels malalts durant un període llarg de temps, els resultats suggereixen que no són significatius d'un grup concret de pacients, a diferència dels Acs anti-MOG, els quals sembla que sí defineixen un grup de malalts amb encefalomielitis aguda disseminada (Di et al., 2011). Per contra, recentment s'ha demostrat que el 46.9% dels malalts amb EM tenen Acs anti-Kir4.1, i malgrat no siguin característics d'un grup concret de malalts amb EM, i no hi hagi correlació entre la presència d'Acs i l'edat o les característiques clíniques, s'ha demostrat que tenen un rol patogènic directe alterant l'expressió de la proteïna GFAP en els astròcits i activant la cascada del complement en els llocs on s'expressa la molècula Kir4.1, i a més es produeix una síntesi intratecal d'Acs. Tot això suggereixen que podrien interferir en la

funció de Kir4.1, alterant la concentració de potassi i l'homeòstasi en la transmissió sinàptica, el que podria provocar el dany tissular o afectar a la remielinització (Srivastava et al., 2012). A diferència d'aquestes dues molècules, els Acs anti-contactina-2 no sembla que tinguin una acció patogènica directa, però els nostres resultats avaluats per cèl·lules HEK transfecades indiquen que la freqüència dels Acs anti-contactina-2 (7.8% dels EMRR), és similar a la d'altres estudis avaluats per Elisa, on la seva freqüència és de 2 positius respecte 25 malalts amb EM (Derfuss et al., 2009).

La contactina-2 és una molècula d'adhesió de la família de les immunoglobulines, localitzada a la regió juxtaparanodal dels axons mielinitzats, expressada en forma d'heterodímer (Poliak et al., 2003). La significació clínica que podrien tenir aquests autoanticossos es qüestiona per la inacessibilitat a l'autoantigen ja que la regió juxtaparanodal conté la baina de mielina, a més, els resultats d'alguns experiments realitzats amb el model animal EAE no mostren un dany addicional associat als Acs anti-contactina-2 (Derfuss et al., 2010). D'aquesta manera, malgrat els Acs anti-contactina-2 persisteixin en el temps, no sembla que indueixin la disfunció neuronal de la substància gris, tal com passaria amb la neurofascina, un altre autoantigen identificat recentment en malalts amb EM (Mathey et al., 2007). Per contra, sí es creu que les cèl·lules T específiques d'Ag són capaces de desencadenar l'efecte patogènic, diferents estudis realitzats sobre l'expressió de contactina-2 en un subgrup de neurones corticals, donarien suport a aquesta hipòtesi (Savvaki et al., 2008), (Derfuss et al., 2009), i aquest efecte patogènic podria ser rellevant perquè en les formes progressives de la malaltia, tant en la secundària com en la primària progressiva, el córtex està notablement afectat per una desmielinització cortical extensiva associada a infiltrats inflamatoris en les leptomeninges (Lassmann et al., 2007). Per un altre costat, els Acs anti-Contactina-2 també s'havien detectat en altres malalties, 5 de 96 pacients amb encefalitis, Morvan o neuromiotonía, presentaven Acs contra aquesta molècula, i 4 d'aquests 5 tenien Acs addicionals contra Caspr2 (2 pacients), contra el LGII (1 pacient), i contra els VGKC (1 pacient) (Irani et al., 2010). A diferència d'aquests resultats, en el nostre estudi cap de les mostres positives presentava Acs addicionals contra caspr2 o el LGII.

V. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. El receptor de GABA_B és l'autoantigen més comú en el grup de pacients caracteritzats per encefalitis límbica associada a càncer de pulmó de cèl·lula petita, prèviament considerats “seronegatius”.
2. En malalts amb anticossos contra el GAD, la freqüència de tenir també anticossos contra el receptor GABA_B és baixa, i només s'observa en un context paraneoplàsic.
3. La detecció d'anticossos contra el receptor AMPA s'hauria de considerar en pacients, particularment dones, majors de 50 anys que presentin encefalitis límbica, o canvis ràpids i progressius de comportaments anormals que recorden a una psicosi aguda.
4. El DPPX és un nou autoantigen de membrana, associat a l'encefalitis caracteritzada per hiperexcitabilitat del sistema nerviós central, precedida per diarrea de causa desconeguda.
5. En l'esclerosi múltiple la freqüència dels anticossos contra la contactina-2 és baixa, persisteixen en el temps, i no s'associen a un perfil clínico-radiològic característic.

VI. BIBLIOGRAFIA

Abbas Abul K, Lichtman Andrew. H. Libro de Immunología celular y molecular, 5a edición, 2007; Editorial Elsevier.

Alamowitch. S, Graus. F, Uchuya. M, Rene. R, Bescansa. E, and Delattre. JY. Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features. *Brain*, 1997; 120(6):923-8.

Albert. ML, Austin. LM, and Darnell. RB. Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann.Neurol*, 2000; 47(1):9-17.

Ances. BM, Vitaliani. R, Taylor. RA, Liebeskind. DS, Voloschin. A, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain*, 2005; 128(8):1764-77.

Breij. EC, Brink. BP, Veerhuis. R, van den Berg. C, Vloet. R, et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann.Neurol*, 2008; 63(1):16-25.

Breithaupt. C, Schubart. A, Zander. H, Skerra. A, Huber. R, et al. Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2003; 100(16):9446-51.

BrierleyJB, Corsellis. JA, Hierons. S, Nevin. S. Subacute encephalitis of later adult life. Mainly affecting the limbic areas. *Brain*, 1960; 83, part 3:357-70.

Buckley. C, Oger. J, Clover. L, Tuzun. E, Carpenter. K, et al. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann.Neurol*, 2001; 50(1):73-8.

Budde-Steffen. C, Anderson. NE, Rosenblum. MK, Graus. F, Ford. D, et al. An antineuronal autoantibody in paraneoplastic opsoclonus. *Ann.Neurol*, 1988; 23(5):528-31.

Carr. I. The Ophelia syndrome: memory loss in Hodgkin's disease. *Lancet*, 1982; I(8276):844-5.

Choi. KY, Chang. K, Pickel. JM, Badger JD, and Roche. KW. Expression of the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) induces melanoma in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2011; 108(37):15219-24.

Corriveau. RA, Huh. GS, and Shatz. CJ. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron*, 1998; 21(3):505-20.

Corsellis. JA, Goldberg. GJ, and Norton. AR. "Limbic encephalitis" and its association with carcinoma. *Brain*, 1968; 91(3):481-96.

Cunningham. J, Graus. F, Anderson. N, and Posner. JB. Partial characterization of the Purkinje cell antigens in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neurology*, 1986; 36(9):1163-8.

Cusick. MF, Libbey. JE, and Fujinami. RS. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin.Rev.Allergy Immunol*, 2012; 42(1):102-11.

Dalmau. J, and Bataller. L. Limbic encephalitis: the new cell membrane antigens and a proposal of clinical-immunological classification with therapeutic implications. *Neurologia*, 2007 22(8):526-37.

Dalmau. J, Gleichman. AJ, Hughes. EG, Rossi. JE, Peng. X, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*, 2008; 7(12):1091-98.

Dalmau. J, Graus. F, Villarejo. A, Posner. JB, Blumenthal. D, et al. Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis. *Brain*, 2004; 127(8):1831-44.

Dalmau. J, Gultekin. SH, Voltz. R, Hoard. R, DesChamps. T, et al. Ma1, a novel neuron- and testis-specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain*, 1999; 122(1):27-39.

Dalmau. J, and Posner. JB. Neurologic paraneoplastic antibodies (anti-Yo; anti-Hu; anti-Ri): the case for a nomenclature based on antibody and antigen specificity. *Neurology*, 1994; 44(12):2241-46.

Dalmau. J, and Rosenfeld. MR. Paraneoplastic syndromes of the CNS. *Lancet Neurol*, 2008; 7(4):327-40.

Dalmau. J, Tüzün. E, Wu. HY, Masjuan. J, Rossi. JE, et al. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann.Neurol*, 2007; 61(1):25-36.

Darnell. RB, and Posner. JB. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N.Engl.J.Med*, 2003; 349(16):1543-54.

De. CP, Thomas. A, Cofiell. R, Folli. F, Lichte. B, et al. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J.Exp.Med*, 1993; 178(6):2219-23.

de. GE, Maat. P, Hulsenboom. E, van den Berg. R, van den Bent. M, et al. Identification of delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor as the Tr antigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann.Neurol*, 2012; 71(6):815-24.

Denny-Brown. D. Primary sensory neuropathy with muscular changes associated with carcinoma. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, 1948; 11(2):73-87.

Derfuss. T, Linington. C, Hohlfeld. R, and Meinl. E. Axo-glial antigens as targets in multiple sclerosis: implications for axonal and grey matter injury. *J.Mol.Med.(Berl)*, 2010; 88(8):753-61.

Derfuss. T, Parikh. K, Velhin. S, Braun. M, Mathey. E, et al. Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2009; 106(20):8302-07.

Di. PF, Mader. S, Rostasy. K, Schanda. K, Bajer-Kornek. B, et al. Temporal dynamics of anti-MOG antibodies in CNS demyelinating diseases. *Clin.Immunol*, 2011; 138(3):247-54.

Dropcho, EJ, Chen. YT, Posner. JB, and Old. LJ. Cloning of a brain protein identified by autoantibodies from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1987; 84(13):4552-6.

Fathallah-Shaykh. H, Wolf. S, Wong. E, Posner. JB, and Furneaux. HM. Cloning of a leucine-zipper protein recognized by the sera of patients with antibody-associated paraneoplastic cerebellar degeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1991; 88(8):3451-4.

Folli. F, Solimena. M, Cofiell. R, Austoni. M, Tallini. G, et al. Autoantibodies to a 128-kd synaptic protein in three women with the stiff-man syndrome and breast cancer. *N.Engl.J.Med*, 1993; 328(8):546-51.

Fukata. Y, Lovero. KL, Iwanaga. T, Watanabe. A, Yokoi. N, et al. Disruption of LGII-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 2010; 107(8):3799-804.

Furneaux. HM, Rosenblum. MK, Dalmau. J, Wong. E, Woodruff. P, et al. Selective expression of Purkinje-cell antigens in tumor tissue from patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *N.Engl.J.Med*, 1990; 322(26):1844-51.

Geis. C, Weishaupt A, Hallermann. S, Grünwald. B, Wessig. C, et al. Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain*, 2010; 133(11):3166-80.

Graus. F, Cordon-Cardo. C, and Posner. JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology*, 1985; 35(4):538-43.

Graus. F, Delattre. JY, Antoine. JC, Dalmau.J, Giometto. B, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, 2004; 75(8): 1135-40.

Graus. F, Elkon. KB, Cordon-Cardo. C, and Posner. JB. Sensory neuronopathy and small cell lung cancer. Antineuronal antibody that also reacts with the tumor. *Am.J.Med*, 1986; 80(1):45-52.

Graus. F, Keime-Guibert. F, Rene. R, Benyahia. B, Ribalta. T, et al. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain*, 2001; 124(6):1138-48.

Graus. F, and Rene. R. Anti-Tr antibodies and cerebellar paraneoplastic degeneration associated with Hodgkin's disease. *Neurologia*, 1996; 11(7):261.

Graus. F, Saiz. A, and Dalmau. J. Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS. *J.Neurol*, 2010; 257(4):509-17.

Graus. F, Saiz. A, Lai. M, Bruna. J, Lopez. F, et al. Neuronal surface antigen antibodies in limbic encephalitis: clinical-immunologic associations. *Neurology*, 2008; 71(12): 930-6.

Greenlee. JE, and Brashear. HR. Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann.Neurol.*, 1983; 14(6):609-13.

Guichard.A, and Vignon. G. La Polyradiculonéurite cancéreuse métastatique. *J.Med.Lyon*, 1949; 30(700):197-207.

Gultekin. SH, Rosenfeld. MR, Voltz. R, Eichen. J, Posner. JB, and Dalmau. J. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain*, 2000; 123(7):1481-94.

Hafler. DA, Compston. A, Sawcer. S, Lander. ES, Daly. MJ, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl.J.Med*, 2007; 357(9):851-62.

Henson. RA, and Urich. H. Encephalomyelitis with carcinoma: Cancer and nervous system. Oxford.Blackwell.Scientific, 1982; 314-45.

Honorat. J, Antoine. JC, Derrington. E, Aguera. M, and Belin. MF. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, 1996; 61(3):270-8.

Honorat. J, Byk. T, Kusters. I, Aguera. M, Ricard. D, et al. Ulip/CRMP proteins are recognized by autoantibodies in paraneoplastic neurological syndromes. *Eur.J.Neurosci*, 1999; 11(12):4226-32.

Hu. W, and Lucchinetti. CF. The pathological spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases. *Semin.Immunopathol*, 2009; 31(4):439-53.

Hughes. EG, Peng. X, Gleichman. AJ, Lai. M, Zhou. L, et al. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J.Neurosci*, 2010; 30(17):5866-75.

Irani DN. Herpes simplex encephalitis, 2nd edition, 2001; In Gilman S. (Ed). Medlink-Neurobase Arbor Publishing.

Irani. SR, Alexander. S, Waters. P, Kleopa. KA, Pettingill. P, et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain*, 2010; 133(9):2734-48.

Jarius. S, Franciotta. D, Paul. F, Ruprecht. K, Bergamaschi. R, et al. Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *J.Neuroinflammation*, 2010; 7: 52.

Kaulin. YA, De Santiago-Castillo. JA, Rocha. CA, Nadal. MS, Rudy. B, and Covarrubias. M. The dipeptidyl-peptidase-like protein DPP6 determines the unitary conductance of neuronal Kv4.2 channels. *J.Neurosci*, 2009; 29(10):3242-51.

Kendrick. SJ, Lynch. DR, and Pritchett. DB. Characterization of glutamate binding sites in receptors assembled from transfected NMDA receptor subunits. *J.Neurochem*, 1996; 67(2):608-16.

- Kroepfl. JF, Viise. LR, Charron. AJ, Linington. C, and Gardinier. MV. Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J.Neurochem*, 1996; 67(5):2219-22.
- Lai. M, Hughes. EG, Peng. X, Zhou. L, Gleichman. AJ, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann.Neurol*, 2009; 65(4):424-34.
- Lai. M, Huijbers. MG, Lancaster. E, Graus. F, Bataller. L, et al. Investigation of LGII as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol*, 2010; 9(8):776-85.
- Lancaster. E, Huijbers. MG, Bar. V, Boronat. A, Wong. A, et al. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann.Neurol*, 2011a; 69(2):303-11.
- Lancaster. E, Lai. M, Peng. X, Hughes. E, Constantinescu. R, et al. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol*, 2010; 9(1):67-76.
- Lancaster. E, Martinez-Hernandez. E, Titulaer. MJ, Boulos. M, Weaver. S, et al. Antibodies to metabotropic glutamate receptor 5 in the Ophelia syndrome. *Neurology*, 2011b; 77(18):1698-701.
- Larizza. D, Calcaterra. V, Klersy. C, Badulli. C, Caramagna. C, and et al. Common immunogenetic profile in children with multiple autoimmune diseases: the signature of HLA-DQ pleiotropic genes. *Autoimmunity*, 2012; 45(6):470-5.
- Lassmann. H, Bruck. W, and Lucchinetti. CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*, 2007; 17(2):210-8.
- Laube. B, Hirai. H, Sturgess. M, Betz. H, and Kuhse. J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron*, 1997; 18(3):493-503.
- Lennon. VA. The case for a descriptive generic nomenclature: clarification of immunostaining criteria for PCA-1, ANNA-1, and ANNA-2 autoantibodies. *Neurology*, 1994; 44(12):2412-5.
- Lichte. B, Veh. RW, Meyer. HE, and Kilimann. MW. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J*, 1992; 11(7):2521-30.
- Luque. FA, Furneaux. HM, Ferziger. R, Rosenblum. MK, Wray. SH, et al. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann.Neurol*, 1991; 29(3):241-51.
- Malter. MP, Helmstaedter. C, Urbach. H, Vincent. A and Bien. CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann.Neurol*, 2010; 67(4):470-8.
- Mathey. EK, Derfuss. T, Storch. MK, Williams. KR, Hales. K, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J.Exp.Med*, 2007; 204(10):2363-72.

Mathey. EK, Derfuss. T, Storch. MK, Williams KR, Hales K, and et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J.Exp.Med.*, 2007; 204(10):2363-72.

Menge. T, Lalive. PH, von Budingen. HC, and Genain. CP. Conformational epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein are targets of potentially pathogenic antibody responses in multiple sclerosis. *J.Neuroinflammation*, 2011; 8:161.

Moscato. EH, Jain. A, Peng. X, Hughes. EG, Dalmau. J, and Balice-Gordon. RJ. Mechanisms underlying autoimmune synaptic encephalitis leading to disorders of memory, behavior and cognition: insights from molecular, cellular and synaptic studies. *Eur.J.Neurosci*, 2010; 32(2):298-309.

Mueller. DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat.Immunol*, 2010; 11(1):21-7.

Nadal. MS, Amarillo. Y, Vega-Saenz de Miera. E, and Rudy. B. Evidence for the presence of a novel Kv4-mediated A-type K(+) channel-modifying factor. *J.Physiol*, 2001; 537(3):801-9.

Nahmias. A J, and Dowdle. WR. Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. *Prog.Med.Viro*, 1968; 10:110-59.

Nicoletti. F, Bockaert. J, Collingridge. GL, Conn. PJ, Ferraguti. F, et al. Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*, 2011; 60(7-8):1017-41.

Palmer. CL, Cotton. L, Henley. JM. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev*, 2005; 57(2):253-77.

Poliak. S, Gollan. L, Martinez. R, Custer. A, Einheber. S, et al. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron*, 1999; 24(4):1037-47.

Poliak. S, Salomon. D, Elhanany. H, Sabanay. H, Kiernan. B, et al. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J.Cell Biol*, 2003; 162(6):1149-60.

Pomicter. AD, Shroff. SM, Fuss. B, Sato-Bigbee. C, Brophy. PJ, and et al. Novel forms of neurofascin 155 in the central nervous system: alterations in paranodal disruption models and multiple sclerosis. *Brain*, 2010; 133(2):389-405.

Quandt. JA, Huh. J, Baig. M, Yao. K, Ito. N, et al., Myelin Basic Protein-Specific TCR/HLA-DRB5*01:01 Transgenic Mice Support the Etiologic Role of DRB5*01:01 in Multiple Sclerosis. *J.Immunol*, 2012; 189(6):2897-908.

Quandt. JA, Huh. J, Baig. M, Yao. K, Ito. N, and et al. Myelin Basic Protein-Specific TCR/HLA-DRB5*01:01 Transgenic Mice Support the Etiologic Role of DRB5*01:01 in Multiple Sclerosis. *J Immunol*. 2012, doi:10.4049/jimmunol.1103087.

Ring, GH, and Lakkis. FG. Breakdown of self-tolerance and the pathogenesis of autoimmunity. *Semin.Nephrol*, 1999; 19(1):25-33.

Rogers. SW, Andrews. PI, Gahring. LC, Whisenand. T, Cauley. K, et al. Autoantibodies to glutamate receptor GluR3 in Rasmussen's encephalitis. *Science*, 1994; 265(5172):648-51.

Rosenfeld. MR, and Dalmau. J, Update on paraneoplastic neurologic disorders. *Oncologist*, 2010; 15(6): 603-17.

Rosenfeld. MR, Eichen. JG, Wade. DF, Posner. JB, and Dalmau. J. Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann.Neurol*, 2001; 50(3)339-48.

Ropper.A and Brown. RH. *Principios de la neurologia*, 2007; 8ed. Editorial Mc Graw Hill.

Russell.DS. Encephalomyelitis and "carcinomatous neurophaty". Van Bogaert. L, Redermecker. J, Hozay. J, Lowenthal. A, editors. *Encephalitides*. Amsterdam: Elsevier. 1961; 131-5.

Sagane. K, Ishihama. Y, and Sugimoto. H. LGII and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. *Int.J.Biol.Sci*, 2008; 4(6):387-96.

Saiz. A, Blanco. Y, Sabater. L, Gonzalez. F, Bataller. L, et al. Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. *Brain*, 2008; 131(10):2553-63.

Sakai. K, Mitchell. DJ, Tsukamoto. T, and Steinman. L. Isolation of a complementary DNA clone encoding an autoantigen recognized by an anti-neuronal cell antibody from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann.Neurol*, 1990; 28(5)692-98.

Sakaguchi. S, Yamaguchi. T, Nomura. T, and Ono. M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008; 133(5):775-87.

Sakai. K, Ogasawara. T, Hirose. G, Jaekle. KA, and Greenlee. JE. Analysis of autoantibody binding to 52-kd paraneoplastic cerebellar degeneration-associated antigen expressed in recombinant proteins. *Ann.Neurol*, 1993; 33(4):373-80.

Savvaki. M, Panagiotaropoulos. T, Stamatakis. A, Sargiannidou. I, Karatzoulia. P, et al. Impairment of learning and memory in TAG-1 deficient mice associated with shorter CNS internodes and disrupted juxtaparanodes. *Mol.Cell Neurosci*, 2008; 39(3):478-90.

Schuler. V, Lüscher. C, Blanchet. C, Klix. N, Sansig. G, et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B(1)). *Neuron*, 2001; 31(1):47-58.

Seeger. RC, Zeltzer. PM, and Rayner. SA. Onco-neural antigen: a new neural differentiation antigen expressed by neuroblastoma, oat cell carcinoma, Wilms' tumor, and sarcoma cells. *J.Immunol*, 1979; 122(4):1548-55.

Seikel. E, and Trimmer. JS. Convergent modulation of Kv4.2 channel alpha subunits by structurally distinct DPPX and KChIP auxiliary subunits. *Biochemistry*, 2009; 48(24):5721-30.

Shams'ili. S, Grefkens. J, De Leeuw. B, van den Bent. M, Hooijkaas. H, et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain*, 2003; 126(6):1409-18.

Shepherd. JD, and Huganir. RL. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu.Rev.Cell.Dev.Biol*, 2007; 23:613-43.

Singh. B, Ogiwara. I, Kaneda. M, Tokonami. N, Mazaki. E, et al. A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol.Dis*, 2006; 24(2):245-53.

Sprengel. R. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Tissue Res*, 2006; 326(2):447-55.

Srivastava.R, Aslam. M, Kalluri. SR, Schirmer. L, Burk. D, et al. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2012; 367(2):115-23.

Smith. M G, Lennette. EH, and Reames. HR. Isolation of the virus of herpes simplex and the demonstration of intranuclear inclusions in a case of acute encephalitis. *Am.J.Pathol*, 1941; 17(1): 55-68.

Standaert. DG, Testa. CM, Young. AB, and Penney. JB. Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *J.Comp Neurol*, 1994; 343(1):1-16.

Stefferl. AU, Brehm. M, Storch. D, Lambracht-Washington. C, Bourquin. K, and et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the "resistant" Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. *J.Immunol*, 1999; 163(1):40-9.

Strader. MB, Tabb. DL, Hervey. WJ, Pan. C, and Hurst. GB. Efficient and specific trypsin digestion of microgram to nanogram quantities of proteins in organic-aqueous solvent systems. *Anal.Chem*, 2006; 78(1):125-34.

Szabo. A, Dalmau. J, Manley. G, Rosenfeld. M, Wong. E, et al. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell*, 1991; 67(2):325-33.

Talukder. RK, Sutradhar. SR, Rahman. KM, Uddin. MJ, and Akhter. H. Guillain-Barre syndrome. *Mymensingh.Med.J*, 2011; 20(4):748-56.

Tanaka. K, Tanaka. M, Igarashi. S, Onodera. O, Miyatake. T, and Tsuji. S. Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. 2. Passive transfer of murine mononuclear cells activated with recombinant Yo protein to paraneoplastic cerebellar degeneration lymphocytes in severe combined immunodeficiency mice. *Clin.Neurol.Neurosurg*, 1995; 97(1):101-5.

- Thieben. MJ, Lennon. VA, Boeve. BF, Aksamit. AJ, Keegan. M, and Vernino. S. Potentially reversible autoimmune limbic encephalitis with neuronal potassium channel antibody. *Neurology*, 2004; 62(7):1177-82.
- Trotter. JL, Hendin. BA, and Osterland. CK. Cerebellar degeneration with Hodgkin disease. An immunological study. *Arch.Neurol*, 1976; 33(9):660-1.
- Ulrich. J, Spiess. H, and Huber. R. Neurological syndrome as a remote effect of a malignant tumor. [Ammon's horn sclerosis in bronchial carcinoma], Schweiz. Arch.Neurol.Neurochir.Psychiatr, 1967; 99(1):83-100.
- Verhaart. W. Grey matter degeneration of the C.N.S. in carcinosis. *Acta Neuropathologica*, 1961; 1:107-112. DOI: 10.1007/BF00685222.
- Vincent. A, Honnorat. J, Antoine. JC, Giometto. B, Dalmau. J, and Lang. B. Autoimmunity in paraneoplastic neurological disorders. *J.Neuroimmunol*, 1998; 84(1):105-9.
- Villoslada. P. Esclerosis múltiple, 1a edición, 2010; Red española de esclerosis multiple. Marge Medica books.
- Vitaliani. R, Mason. W, Ances. B, Zwerdling. T, Jiang. Z, and Dalmau. J. Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma. *Ann.Neurol*, 2005; 58(4):594-604.
- Voltz. R, Gultekin. SH, Rosenfeld. MR, Gerstner. E, Eichen. J, et al. A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Engl.J.Med*, 1999; 340(23):1788-95.
- Vulliemoz. S, Vanini. G, Truffert. A, Chizzolini. C, and Seeck. M. Epilepsy and cerebellar ataxia associated with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *BMJ Case.Rep*, 2009.
- Warren. KG, and Catz. I. Cerebrospinal fluid autoantibodies to myelin basic protein in multiple sclerosis patients. Detection during first exacerbations and kinetics of acute relapses and subsequent convalescent phases. *J.Neurol.Sci*, 1989; 91(1-2):143-51.
- Warren. KG, and Catz. I. Relative frequency of autoantibodies to myelin basic protein and proteolipid protein in optic neuritis and multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J.Neurol.Sci*, 1994; 121(1):66-73.
- Waxman. EA, and Lynch. DR. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist*, 2005; 11(1):37-49.
- Weiner. HL. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease?. *Ann.Neurol*, 2009; 65(3):239-48.
- Whitley. RJ, and Roizman. B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 2001; 357(9267):1513-18.
- Wilkinson. PC, and Zeromski. J. Immunofluorescent detection of antibodies against neurones in sensory carcinomatous neuropathy. *Brain*, 1965; 88(3):529-83.

Yahr. MDR, Duvoisin. C, and Cowen. D. Encephalopathy associated with carcinoma. Trans.Am.Neurol.Assoc, 1965; 90:80-6.

Yang. YY, Yin. GL, and Darnell. RB. The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1998; 95(22):13254-9.

Yu. Z, Kryzer. TJ, Griesmann. GE, Kim. K, Benaroch. EE, and Lennon. VA. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. Ann.Neurol, 2001; 49(2):146-54.

Zarafonetis. C J, and Smadel. JE. Fatal Herpes Simplex Encephalitis in Man. Am.J.Pathol, 1944; 20(3): 429-45.

Zhu. H, Hasman. RA, Barron. VA, Luo. G, and Lou. H. A nuclear function of Hu proteins as neuron-specific alternative RNA processing regulators. Mol.Biol.Cell, 2006; 17(12):5105-14.

VII. ANNEX I

Descripció d'altres anticossos onconeuronals.

Els Acs onconeuronals reaccionen contra proteïnes intracel·lulars, expressades en el teixit nerviós i en el tumor, i la majoria intervenen directa o indirectament en processos cel·lulars com la replicació i transcripció del material genètic, o la diferenciació, migració i apoptosi cel·lular. La freqüència d'expressió en malalts amb SNP concretes és alta, i actualment són molt útils tant per ajudar a definir el diagnòstic de moltes SNP, com per orientar en el tipus de càncer que pot tenir el pacient. En el cas de l'encefalitis, els principals Acs onconeuronals associats són els anti-Hu i anti-Ma2, tot i que en menor freqüència també podem trobar pacients que tinguin Acs anti-amfifisina i anti-CV2. En general els malalts tenen una resposta poc satisfactòria al tractament d'immunoteràpia. I les tècniques més utilitzades per detectar els Acs onconeuronals clàssics són la immunohistoquímica i l'immunoblot.

La immunohistoquímica és la primera tècnica que es realitza per detectar la presència d'Acs onconeuronals en el sèrum o LCR dels malalts. El sèrum o LCR es posa en contacte amb el teixit de rata congelat, prèviament perfós amb paraformaldehid i preservat amb sucrosa, després un Ac secundari marcat amb biotina s'unirà a les IgG del pacient, i en afegir l'avidina-biotina es formarà un macrocomplex proteic, que posteriorment en afegir la DAB (tetrahidroclorur 3,3'-diaminobencidina) es donarà una reacció enzimàtica que es farà insoluble i visible. D'aquesta manera aquesta tècnica permet observar la reactivitat dels Acs onconeuronals, cada autoantigen té una distribució determinada en el cervell, i en conseqüència cada Ac es pot associar a un patró immunohistoquímic característic. Cal tenir en compte però, que alguns patrons són similars entre ells, de manera que és necessari l'ús de tècniques alternatives per tal de confirmar els resultats.

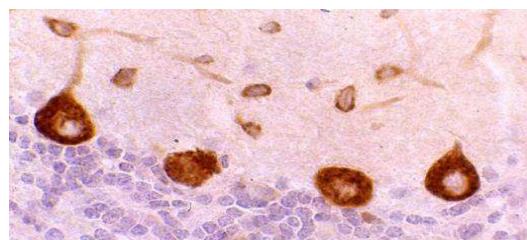
L'immunoblot es realitza per confirmar els resultats que la immunohistoquímica i la clínica del pacient suggereixen, i es basa en la detecció de proteïnes específiques. Es posa en contacte el sèrum o LCR amb una membrana que conté extractes de la proteïna contra la que sospitem que el pacient té reactivitat, i els resultats es rebel·len pel mètode de l'avidina-biotina-peroxidasa. La visualització d'una banda amb el pes molecular corresponent al de la proteïna confirmarà els resultats.

Anticossos anti-Yo (PCA-1)

Els Acs anti-Yo van ser detectats per primera vegada al 1983, quan Greenlee i Brashear (Greenlee and Brashear, 1983) van descriure el cas de dos pacients amb degeneració cerebel·losa paraneoplàsica, càncer d'ovari, i elevats títols d'Acs contra les cèl·lules de Purkinje, però no va ser fins al 1986 quan Cunningham, Posner i els seus col·laboradors els van detectar per immunoblot. Poc després Dropcho clonava la proteïna de 34 KDa contra la qual reaccionaven els Acs dels malalts amb degeneració cerebel·losa paraneoplàsica (Dropcho et al., 1987), més tard Sakai clonava l'Ag de 52 KDa (Sakai et al., 1990), i poc després Fathallah-Shaykh clonava un Ag de 62 KDa (Fathallah-Shaykh et al., 1991), tot i que els resultats suggerien que l'Ag de 52 KDa i el de 62 KDa compartien molts epítops (Sakai et al., 1993). Per un altre costat el grup de Posner van demostrar que aquests Acs anaven dirigits contra el citoplasma de les cèl·lules de Purkinje del cerebel i neurones del tronc cerebral, i s'associaven a la degeneració cerebel·losa (Furneaux et al., 1990). I al 1990 Furneaux i els seus col·laboradors van anomenar CDR (cerebellar-degeneration-related) a l'Ag que reconeixien els Acs anti-Yo.

Els Acs anti-Yo tenen dues dianes antigèniques, el CDR1 (34KDa), i CDR2 (62KDa), sent el CDR2 l'Ag majoritari, expressat en el tumor i en el SN. És una proteïna intracel·lular situada a les cèl·lules de Purkinje, i la seva funció no es coneix massa bé, però es creu que actua sobre el factor nuclear NF-K_B evitant la seva unió al ADN i inhibint la capacitat transcripcional (Cunningham et al., 1986), (Furneaux et al., 1990).

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-Yo



Fotografia realitzada per nosaltres

Els Acs anti-Yo s'associen principalment a dones amb degeneració cerebel·losa paraneoplàsica (comencen amb nàusees i vòmits, seguit d'atàxia, diploïdia, disàtria, i disfàgia, i evolucionen fins la disfunció cerebel·losa subaguda i progressiva), i tumors ginecològics (sobretot càncer d'ovari o de mama). Aquests pacients no acostumen a tenir altres Acs onconeuronals, però un 2% dels pacients amb càncer sense SNP també expressen Acs anti-Yo.

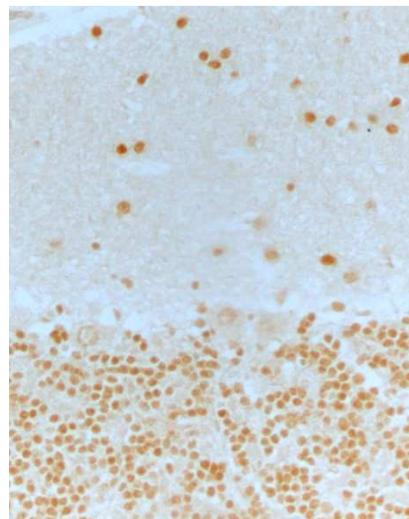
Anticossos anti-Ri (ANNA-2, anti-Nova)

Els Acs anti-Ri van ser identificats per primera vegada per Posner i Budde-Steffen al 1988, quan van observar que un Ac present en el sèrum d'un pacient amb opsoclonus, atàxia i càncer de mama reaccionava contra els nuclis neuronals (Budde-Steffen et al., 1988), però no es va acabar de caracteritzar totalment fins al 1991, quan Luque i els seus col·laboradors van descriure la presència d'Acs anti-Ri en el sèrum i LCR de 6 dones amb atàxia, opsoclonus i algun càncer ginecològic. (Luque et al., 1991). Aquests anticossos també es coneixen amb el nom de ANNA-2 (Lennon, 1994).

La diana antigènica dels Acs anti-Ri s'anomena Nova-1. Nova-1 és una proteïna d'unió a l'ARN que s'expressa preferentment en neurones del SNC i cèl·lules de Purkinje. Els Acs anti-Ri provoquen que les proteïnes Nova-1 perdin la capacitat d'unió a l'ARN, i en conseqüència els pacients pateixen alteracions motores.

Alguns pacients també reaccionen contra Nova-2 degut a l'elevada homologia amb Nova-1, una altra proteïna d'unió a l'ARN, de la mateixa família que nova-1, que es distribueix més àmpliament i a més està implicada en el metabolisme de l'ARN, de manera que aquests pacients a més tenen encefalopaties i demència. En general les proteïnes de la família Nova estan implicades en el desenvolupament i fenotip neuronal (Yang et al., 1998), (Dalmau and Posner, 1994).

Patró immunohistoquímic d'Acs anti-Ri



Fotografia realitzada per nosaltres

Els Acs anti-Ri s'associen principalment a la síndrome d'opsoclonus/mioclonus, i a l'atàxia troncal primària. Els pacients es caracteritzen per patir una paràlisi supranuclear de la mirada, rigidesa muscular, mareig, disàtria i disfàgia. És més freqüent en dones, i acostuma a anar associada a càncer de mama, carcinomes d'ovari, i trompes de fal·lopi, tot i que també s'han descrit casos de CPCP. En el cas dels homes s'associa al càncer de pròstata i més freqüentment al càncer de pulmó. Els pacients amb Acs anti-Ri també poden tenir Acs anti-Hu, i en aquest cas s'associen a CPCP (Luque et al., 1991).

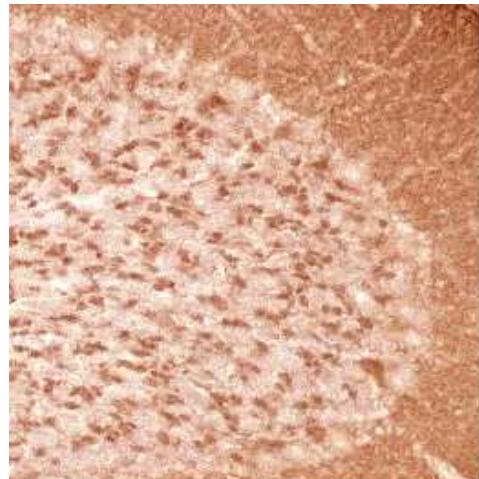
Anticossos Anti-Amfifisina

Al 1993 Folli i Pietro De Camilli van identificar la presència d'Acs dirigits contra una proteïna neuronal de 128 KDa concentrada a les sinapsis del SNC, en tres dones amb la síndrome de la persona rígida i càncer de mama. El 60% dels pacients amb aquesta síndrome i sense càncer tenen Acs contra el GAD (Folli et al., 1993), però les tres pacients de Folli i Prieto De Camilli tenien Acs diferents als anti-GAD. Recentment Lichete havia descrit les característiques de la proteïna amfifisina, i per les similituds entre aquelles descripcions i les característiques de les tres dones (Lichte et al., 1992),

De Camilli va pensar que els Acs dels seus pacients podien anar dirigits contra aquesta proteïna, i per la tècnica de l'immunoblot van demostrar que el nou Ag associat a la síndrome de la persona rígida corresponia a l'amfifisina (De et al., 1993).

La diana antigènica d'aquests Acs es troba a la zona del C-terminal de l'amfifisina. Pertany a la família de les proteïnes BAR (*Bin-anfifisina-Rsvsp*) i té dos isoformes, la I i la II, sent l'amfifisina tipus I l'Ag majoritari. Està concentrada a la zona pre-sinàptica, i és essencial per la correcta endocitosi de les vesícules pre-sinàptiques dependents de clatrina.

Patró immunològic dels Acs anti-amfifisina



Fotografia realitzada per nosaltres

Els Acs anti-amfifisina s'associen a la síndrome de la persona rígida (caracteritzada per dolor i rigidesa dels músculs axials) i càncer de mama o CPCP, i en menor freqüència a SNP sense evidència de tumor. Els pacients amb Acs anti-amfifisina i CPCP poden tenir també Acs anti-Hu.

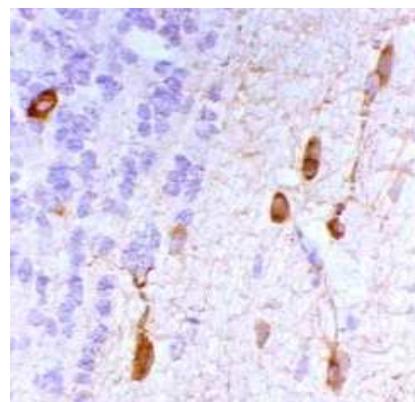
Anticossos Anti-CV2 (CRMP-5)

Al 1996 Honnorat, Belin i els seus col·laboradors, van estudiar un grup de pacients amb diferents SNP i càncer als quals no se'ls hi havia detectat Acs. Amb l'objectiu d'identificar nous autoantígens que podien haver passat desapercebuts per la manera de processar el teixit, el grup d'Honnora van utilitzar un mètode de fixació diferent al

que s'utilitzava habitualment (paraformaldehid en lloc d'acetona), i van estudiar 45 pacients amb SNP. Alguns d'aquests pacients mostraven reactivitat contra un Ag localitzat en una subpoblació de cèl·lules glials, probablement oligodendròcits de la substància blanca del cervell, cerebel i medul·la espinal, i per la tècnica d'immunoblot, van veure que els Acs dels 11 pacients amb SNP associades a la degeneració neuronal i càncer sistèmic, reaccionaven contra una proteïna citoplasmàtica de 66 KDa, a la que van anomenar CV2 (Honorat et al., 1996). Tres anys més tard van demostrar que els Acs anti-CV2 reconeixien un grup de proteïnes anomenades CRMP (Honorat et al., 1999).

La principal diana antigènica dels Acs anti-CV2 és la proteïna CRMP5, de la família de les CRMP (*Collapsin Response Mediator Proteins*). Té 66 KDa, s'expressa en el SN, i la seva funció està involucrada, a nivell cel·lular i molecular, en la proliferació, migració, diferenciació i apoptosi de cèl·lules neuronals. En el cervell adult l'expressió no és gaire elevada, i es concentra a la subpoblació dels oligodendròcits. En el SN perifèric s'expressa en un subgrup de neurones sensorials i en les cèl·lules de Schwann.

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-CV2



Fotografia realitzada per nosaltres

Els Acs anti-CV2 s'associen preferentment a la neuropatia perifèrica, atàxia cerebel·lar, corea i uveïtis. El càncer més freqüent és el CPCP, però també el podem trobar en malalts amb timoma. Els pacients amb CPCP i Acs anti-CRMP5 (anti-CV2), poden tenir també Acs anti-Hu i anti-Zic, i acostumen a tenir encefalopaties amb déficits multifocals. Per altra banda, aquest Ac també es troba en pacients amb CPCP sense SNP (9%) (Yu et al., 2001) (Dalmau and Rosenfeld, 2008).

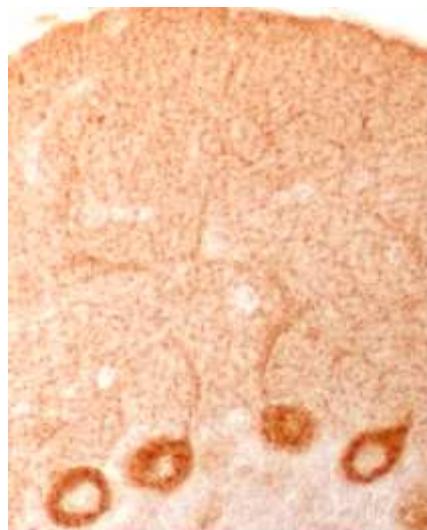
Anticossos Anti-Tr (PCA-Tr)

Al 1976 Trotter i els seus col·laboradors van descriure el cas d'un pacient amb limfoma de Hodgkin i Acs contra algun epítop de les cèl·lules de Purkinje, que possiblement era responsable dels símptomes neurològics (Trotter et al., 1976). Al cap de 20 anys Graus i el seu grup van descriure la presència d'Acs que immunoreaccionaven contra les cèl·lules de Purkinje de la capa molecular del cerebel amb un patró citoplasmàtic puntejat en la zona de l'arbre dendrític i soma, en cinc pacients amb limfoma de Hodgkin i degeneració cerebel·losa paraneoplàsica, però els estudis per caracteritzar-lo mitjançant l'immunoblot i tècniques de clonació no van resultar, el que suggeria que es tractava d'un epítop conformacional (Graus and Rene, 1996). L'Ac es va anomenar anti-Tr, però no va ser fins al 2012 quan Graff, Smith i els seus col·laboradors mitjançant la immunoprecipitació van identificar la diana antigènica d'aquest Ac en un pacient amb limfoma de Hodgkin i sense cap signe d'ataxia. L'Ag corresponia a una proteïna anomenada DNER, identificada després en 12 pacients més amb degeneració cerebel·losa paraneoplàsica (de et al., 2012).

DNER (*Delta/Notch-like epidermal Growth Factor*) s'expressa en tot el cervell però està altament concentrat en les cèl·lules de Purkinje del cerebel i neurones piramidals de l'hipocamp, i sota condicions de permeabilització es pot veure un patró puntejat característic. Aquest factor de creixement intervé en les interaccions neurona-glia que es donen en les vies de senyalització de Notch, i la diana antigènica són dos epítops del domini extracel·lular, uns pacients reaccionen contra la regió dels aminoàcids 128-308 i altres contra la regió 302-675, però no sembla que es correlacioni amb una clínica diferent. Els Acs anti-Tr immunoreaccionen només quan DNER està N-glicosilat, el que suggereix que el reconeixement podria estar associat al plegament proteic després de la N-glicosilació.

Els Acs no provoquen canvis morfològics en les neurones hipocampals ni cèl·lules cerebel·lars, tot i que es creu que d'alguna manera alteren la funció de DNER, i això causaria l'atàxia. L'anàlisi de les autòpsies mostren una pèrdua de cèl·lules de Purkinje i suggereixen que el rol patogènic està mediat per les cèl·lules T citotòxiques, de manera que els Acs no serien patogènics, però es podrien utilitzar com a biomarcadors (de et al., 2012).

Patró immunohistoquímic dels Acs anti-Tr



Fotografia realitzada per nosaltres

Els Acs anti-Tr s'associen a la degeneració cerebel·losa paraneoplàsica i al limfoma de Hodgkin. Els pacients amb degeneració cerebel·losa paraneoplàsica es caracteritzen per un inici de nàusees i àvuls, seguit d'atàxia, diploïdia, disàrtria, i disfàgia, i evolucionen fins la disfunció cerebel·losa subaguda i progressiva (Graus and Rene, 1996), (de et al., 2012), (Shams'ili et al., 2003).

VII. ANNEX II

RESUM DELS ARTICLES

EN CATALÀ

Anticossos contra el receptor GABA_B en l'encefalitis límbica i altres síndromes associades a anticossos anti-GAD (RESUM).

Recentment s'ha descrit la presència d'Acs anti-R-GABA_B en 15 pacients amb EL i CPCP ó Acs anti-GAD. Amb l'objectiu d'analitzar la freqüència d'Acs anti-R-GABA_B en aquests dos perfils, vam estudiar el cas de 147 pacients amb EL o altres síndromes neurològiques associades a Acs anti-GAD.

Vam analitzar per la tècnica d'immunofluorescència indirecta sobre cèl·lules HEK transfectades amb les subunitats B1 i B2 del R-GABA_B, el sèrum o LCR de 70 pacients amb EL (51 paraneoplàsica, dels quals 33 tenien Acs onconeuronals i 18 no en tenien, i 19 amb EL idiopàtica), i 77 pacients amb altres síndromes associades a la presència d'Acs anti-GAD (29 amb síndrome de la persona rígida, 28 amb atàxia cerebel·lar, 14 amb epilepsia, i 6 eren paraneoplàsics). Dels 147 pacients, 11 van resultar positius per aquest autoantigen, i els vam detectar preferentment en malalts amb EL. El 14% dels pacients amb EL (10 dels 70) tenien Acs contra el R-GABA_B, i el 80% (dels 10, 8 pacients) tenien CPCP. Els 2 pacients restants eren idiopàtics. Aquests resultats indiquen que els Acs anti-R-GABA_B són més freqüents en els casos amb ELP (8 dels 51) respecte els casos d'EL idiopàtica (2 de 19). I dins el grup d'ELP els esperarem trobar sense Acs onconeuronals clàssics associats (tan sols 1 que tenia CPCP tenia a més Acs contra l'Hu).

Per contra, no vam detectar Acs anti-R-GABA_B en cap pacient amb Acs anti-GAD i la síndrome de la persona rígida, atàxia cerebel·lar, o epilepsia, només 1 dels sis pacients amb atàxia cerebel·lar paraneoplàsica i Acs anti-GAD presentava també Acs anti-R-GABA_B.

9 dels 10 pacients amb EL i Acs anti-R-GABA_B eren dones, de 60 anys de mitjana d'edat, i 8 van presentar convulsions.

D'aquest estudi podem concloure que els Acs anti-R-GABA_B són els Acs més freqüents en els pacients amb un perfil d'EL associada a CPCP, prèviament considerats “seronegatius”. Per contra, en pacients amb Acs anti-GAD, la freqüència de trobar també Acs anti-R-GABA_B és baixa, i només observada en un context paraneoplàsic.

Perfil clínic de l'encefalitis associada a anticossos contra el receptor AMPA (RESUM).

Recentment s'havia descrit la presència d'Acs anti-R-AMPA en 10 malalts d'un estudi realitzat amb 109 pacients amb EL. Amb l'objectiu de descriure el perfil clínic d'aquests malalts, vam estudiar el cas de 30 pacients: 17 d'ells tenien EL típica (dels quals 4 tenien Acs anti-VGKC, 4 anti-GAD, 2 anti-AMPA, 1 anti-AK5, 1 anti-Hu, i 5 no presentaven Acs), i 13 no complien estrictament el criteri d'EL però es presentaven amb comportaments anormals que recordaven una psicosis aguda (11 dels quals tenien Acs anti-R-NMDA i 2 anti-R-AMPA).

En total 4 pacients presentaven Acs contra el receptor AMPA. 2 d'ells tenien EL i CPCP, i 2 presentaven confusió, agitació, i ràpids i progressius canvis de comportament anormals. L'examen neurològic era normal, els estudis de LCR i estudis d'imatge eren negatius i els electroencefalogrames eren normals. Tots es van tractar amb corticosteroides i van respondre al tractament.

La detecció d'Acs anti-R-AMPA s'haurien de considerar en pacients, particularment dones, de més de 50 anys, que presenten EL o canvis de comportament ràpids i progressius, que recorden a una psicosis aguda. Les proves convencionals d'estudis d'imatge (MRI de l'anglès *brain magnetic resonance imaging*) i LCR no són indicatius de la malaltia, i els Acs es poden detectar per immunohistoquímica sobre teixit de rata post-fixat o teixit perfós amb paraformaldehid (mètode habitual per la detecció dels Acs onconeuronals), i es detecten preferentment en el LCR (en un dels malalts el sèrum era negatiu). Els resultats suggereixen que la causa és immunomediada, i els pacients responen al tractament amb immunosupressors.

Encefalitis i anticossos contra el DPPX, una proteïna associada a la subunitat Kv4.2 dels canals de potassi (RESUM).

Amb l'objectiu de descriure nous autoantígens, vam seleccionar 4 pacients amb encefalitis d'etologia desconeguda i Acs de reacció similar contra el neuròpil del cervell de rata. L'autoantigen es va caracteritzar per immunoprecipitació i espectrometria de masses, i els resultats es van comprovar per immunoblot i cèl·lules transfectades, i també es van fer experiments amb ratolins deficientes en aquesta proteïna.

Els 4 pacients, 2 homes i 2 dones, d'entre 45 i 76 anys es van presentar amb un quadre agut de confusió, mioclonus, tremolars i convulsions. Tots tenien pleocitosi, la ressonància magnètica era normal, i l'encefalitis va anar precedida de diarrea severa d'etologia desconeguda en 3 dels pacients. El sèrum i LCR dels 4 malalts, però cap dels 149 controls, que incloïen malalts amb malalties inflamatòries, no inflamatòries i individus sans, presentaven Acs contra el DPPX (una proteïna de membrana que regula els canals de potassi Kv4.2.). 2 dels malalts presentaven a més reactivitat contra epítrops intracel·lulars, i un altre malalt tenia a més reactivitat contra un Ac no caracteritzat. Tres dels pacients van ser tractats amb immunosupressors, i la recuperació neurològica va ser lenta (< 1 any) però important, tot i que associada a recaigudes al retirar o disminuir la immunoteràpia (no hi ha seguiment d'un dels malalts).

D'aquest estudi podem concloure que els Acs contra el DPPX s'associen a una encefalitis prolongada caracteritzada per hiperexcitabilitat del SNC (agitació, mioclonus, tremolars i convulsions), pleocitosi i diarrea en la fase inicial. Malgrat això, la síndrome és potencialment tractable amb immunoteràpia.

Anàlisi dels anticossos contra epítops de superfície de la contactina-2 en l'Esclerosi múltiple (RESUM).

Recentment s'ha identificat la contactina-2 com un autoantigen reconegut per les cèl·lules T, i s'ha detectat la presència d'Acs anti-contactina-2 en alguns malats amb EM.

Amb l'objectiu d'analitzar la freqüència i la significació clínica dels Acs anti-contactina-2, vam realitzar un estudi amb 105 malts amb EM: 19 amb la síndrome clínica aïllada, 51 amb EM en fase remitent-recurrent, 20 en fase secundàriament progressiva, i 15 en fase progressiva primària. En total vam detectar Acs contra la contactina-2 en 4 pacients, tots en fase remitent-recurrent (7.8%), els Acs persistien al llarg del temps, i només els vam detectar en el sèrum, no en el LCR.

D'aquest estudi podem conoure que la freqüència dels Acs anti-contactina-2 en malats amb EM és baixa, i només els hem detectat en el grup d'EM remitent-recurrent, tot i que no s'associen a cap perfil clinico-radiològic determinat, i tampoc són predictius d'un subtípus o d'un pronòstic d'EM.

IX. ALTRES PUBLICACIONS

Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia.

Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, Wilson C, Jacobs D, Lai M.

Ann Neurol. 2011; 69(2):303-11



NIH Public Access

Author Manuscript

Ann Neurol. Author manuscript; available in PMC 2012 February 1.

Published in final edited form as:

Ann Neurol. 2011 February ; 69(2): 303–311. doi:10.1002/ana.22297.

Investigations of Caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia

Eric Lancaster, M.D., Ph.D^{1,*}, Maartje GM Huijbers, B.S^{1,*}, Vered Bar, Ph.D², Anna Boronat, BSc¹, Andrew Wong¹, Eugenia Martinez-Hernandez, MD¹, Christina Wilson, M.D., Ph.D¹, Dina Jacobs, M.D¹, Meizan Lai, M.D¹, Russell W Walker, M.D³, Francesc Graus, M.D⁴, Luis Bataller, M.D⁵, Isabel Illa, M.D⁶, Sander Markx, M.D⁷, Kevin A. Strauss, M.D⁸, Elior Peles, Ph.D², Steven S Scherer, M.D., Ph.D¹, and Josep Dalmau, M.D., Ph.D¹

¹ Department of Neurology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA

² Department of Molecular Cellular Biology, the Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

³ Barrow Neurological Institute, St. Joseph's Hospital and Medical Center, Phoenix, Arizona

⁴ Service of Neurology, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona and Institut d'investigacio Biomedica Agusti Pi Sunyer (IDIBAPS), Spain

⁵ Department of Neurology, University Hospital La Fe, Valencia, Spain

⁶ Department of Neurology, Hospital de Sant Pau, Universitat Autonoma de Barcelona, Spain

⁷ Department of Psychiatry, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, NY

⁸ Clinic for Special Children, Strasburg, P.A., and Department of Biology, Franklin and Marshall College, Lancaster, P.A., and Lancaster General Hospital, Lancaster, P.A

Abstract

Objective—To report clinical and immunological investigations of contactin-associated protein-like 2 (Caspr2), an autoantigen of encephalitis and peripheral nerve hyperexcitability (PNH) previously attributed to voltage-gated potassium channels (VGKC).

Methods—Clinical analysis of patients with encephalitis, PNH, or both. Immunoprecipitation and mass spectrometry were used to identify the antigen and to develop an assay with Caspr2-expressing cells. Immunoabsorption with Caspr2 and comparative immunostaining of brain and peripheral nerve of wild-type and *Caspr2*-null mice were used to assess antibody specificity.

Results—Using Caspr2-expressing cells, antibodies were identified in 8 patients but not in 140 patients with several types of autoimmune or viral encephalitis, PNH, or mutations of the Caspr2-encoding gene. Patients' antibodies reacted with brain and peripheral nerve in a pattern that co-localized with Caspr2. This reactivity was abrogated after immunoabsorption with Caspr2 and was absent in tissues from *Caspr2*-null mice. Of the 8 patients with Caspr2 antibodies, 7 had encephalopathy or seizures, 5 neuropathy or PNH, and 1 isolated PNH. Three patients had also

Corresponding author: Josep Dalmau, MD, PhD, Department of Neurology, 3 W. Gates (Division of Neuro-oncology), University of Pennsylvania, 3400 Spruce Street, Philadelphia, PA 19104, Phone: 215-746-4707, Fax: 215-746-4717,
josep.dalmau@uphs.upenn.edu.

*both authors have contributed equally

Conflicts of Interest

EL has received grant support from Talecris, a company which sells human immunoglobulin. A patent application for the use of Lgi1 antibody detection in patients' CSF and sera has been filed by JD. No other authors have conflicts of interest.

myasthenia gravis, bulbar weakness, or symptoms that initially suggested motor neuron disease. None of the patients had active cancer; 7 responded to immunotherapy and were healthy or only mildly disabled at last follow-up (median 8 months, range 6–84).

Interpretation—Caspr2 is an autoantigen of encephalitis and PNH previously attributed to VGKC antibodies. The occurrence of other autoantibodies may result in a complex syndrome that at presentation could be mistaken for a motor neuron disorder. Recognition of this disorder is important because it responds to immunotherapy.

Keywords

autoimmune; encephalitis; seizures; neuromyotonia; peripheral nerve hyperexcitability; VGKC; Caspr2

Introduction

We recently reported that leucine-rich glioma inactivated 1 (Lgi1) is the main autoantigen of limbic encephalitis previously attributed to VGKC.¹ In that study we also demonstrated that neither Lgi1 nor VGKC are the target antigens in patients with disorders other than limbic encephalitis who also have antibodies previously attributed to VGKC. A direct immunoprecipitation technique showed that one of these antigens is contactin-associated protein-like 2 (Caspr2), but the clinical and immunological associations of these antibodies were not further examined. Here we describe the index patient whose serum was used to isolate Caspr2, and examine the clinical and immunological associations in 7 additional patients with this autoimmunity. We also demonstrate that antibodies to Caspr2 specifically account for the reactivity of these patients' CSF or sera against brain and peripheral nerve.

Patients and Methods

The term “antibodies attributed to VGKC” is used in this study to define antibodies identified by a radioimmunoassay based on the immunoprecipitation of brain protein complexes containing VGKC labeled with ^{125}I - α -dendrotoxin (^{125}I - α -dendrotoxin RIA) or by immunohistochemical methods.^{2–4} Because specific assays show that in patients with limbic encephalitis and antibodies attributed to VGKC the main target antigen is Lgi1, and because Caspr2 was precipitated with serum of a patient with encephalitis and peripheral neuropathy,¹ a goal of the current study was to determine whether patients with encephalitis or peripheral nerve dysfunction suspected to be related to VGKC antibodies had in fact Caspr2 antibodies. The term peripheral nerve hyperexcitability (PNH) was used to include acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome) or partial manifestations of this disorder such as cramps and fasciculations without clear evidence of neuromyotonia. The groups of patients examined to identify the seven additional cases included 49 patients with limbic encephalitis previously attributed to VGKC antibodies, 18 with acquired peripheral nerve hyperexcitability (PNH), 15 with encephalitis and atypical antibodies against the neuropil of hippocampus, and 6 with Morvan's syndrome. As control samples we used serum or CSF from 19 patients with other autoimmune encephalitis associated with NMDA (7), AMPA (6), or GABAB (6) receptor antibodies, 13 patients with Rasmussen's encephalitis, and 6 patients with viral encephalitis. Additionally, since some disorders with genetic mutations (e.g., hereditary ataxias) associate with tendency to autoimmunity,⁵ and patients with mutations of *CNTNAP2* (the gene that codes for Caspr2) develop symptoms resembling those of patients with Caspr2 antibodies including, seizures, hyperactivity, encephalopathy⁶ and sometimes neuromyotonia (discussed later), we examined 21 patients with polymorphisms or mutations of *CNTNAP2* for antibodies to Caspr2. Studies were approved by the University of Pennsylvania Institutional Review Board.

Immunocytochemistry on Caspr2-expressing cells

To generate a diagnostic cell-based assay, human embryonic kidney 293 cells (HEK293) were transiently transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen) and a plasmid containing human Caspr2.¹ Patients' CSF (diluted 1:5) or sera (1:200) and a commercial rabbit antibody to Caspr2 (1:10,000, Abcam ab93228) were applied to cells, followed by FITC-conjugated anti-human-IgG (1:1000, Molecular Probes) and TRITC-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (1:1000, Jackson Laboratories). Images of transfected cells were captured with an epifluorescence microscope using Zeiss Axiovision software (Zeiss, Thornwood, NY, USA).

Immunohistochemistry on brain and peripheral nerve

Adult rat brains were prepared for immunohistochemical screening.⁴ Female Wistar rats were sacrificed without perfusion, the brains removed and immersed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 1 hour, cryoprotected in 40% sucrose for 24 hours, snap frozen in chilled isopentane, and sectioned. *Caspr2*-null mice and their wild-type littermates were generated and genotyped as reported,⁷ and the brains were prepared and sectioned as above. For studies labeling peripheral nerve with patients' antibodies, unfixed teased rat or mouse sciatic nerve fibers were prepared as previously described for paraformaldehyde fixed nerves.⁸

Immunohistochemistry was done using a standard avidin-biotin peroxidase method, using serum (1:200) or CSF (1:5) on 7 µm sagittal brain sections followed by the appropriate secondary antibodies.⁴

Teased nerve fibers were permeabilized with acetone (−20°C for 10 minutes), washed with phosphate buffered saline (PBS, 5 minutes x3), blocked with 5% goat serum (1 hour, room temperature), then incubated with serum (1:200 to 1:4000) or CSF (1:5) and a rabbit antibody to Caspr2 (Abcam, ab93228; diluted 1:300) overnight at 4°C, followed by FITC-conjugated anti-human-IgG (1:200, Molecular Probes) and TRITC-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:300, Jackson Laboratories) for 1 hour at room temperature. An anti-human-IgM antibody (1:200 Molecular Probes) was used for some experiments to confirm that patients' antibodies are of the IgG type. In some experiments, paranodes were labeled with a monoclonal antibody to CASPR (1:50) described previously,⁹ followed by a Cy5-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Jackson Laboratories, 1:200). Images of peripheral nerve were captured with an epifluorescence microscope using Openlab 3.1.7 software (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Immunoabsorption was carried out with serial incubations of patient's CSF in 6 wells containing fixed, permeabilized HEK293 cells expressing Caspr2 or a control plasmid without an insert. After sequential passes of 1 hour each, the CSF was applied to brain or peripheral nerve as described above.

Results

Index patient (case #1)

A 68 year-old man was evaluated for seizures and memory difficulties. Over the previous 2 years he had had 3 seizures, consisting of staring and unresponsiveness followed by generalized tonic-clonic convulsions. Approximately 1 year before evaluation, he developed progressive memory difficulties. He often repeated himself, and had difficulty learning new information and recalling names of close acquaintances. He occasionally became lost while driving in familiar surroundings. Starting 3 years earlier, he had painful hypersensitivity to warm temperatures affecting his hands and feet that persisted for 2 years and spontaneously resolved. Twelve months after the onset of seizures, he had low-grade, non-invasive bladder

cancer that was treated with local scraping and cauterization; this has not recurred. He smoked (40–50 packs/year) and drank approximately 8 alcoholic drinks per week.

His MMSE was 29/30 (missed recall of one item at 5 minutes). He was able to name 12/15 objects on the Boston Naming test. Neuropsychological testing revealed a mild memory deficit, with difficulties in visuospatial and nonverbal memory. Cranial nerve function, strength and muscle tone were normal. Sensation of vibration was decreased on the toes, but sensation of cold, proprioception, and pinprick was intact. Reflexes were 2/5 and symmetrical. His gait was slightly wide-based, and he had difficulty performing tandem gait.

Brain MRI demonstrated bilateral mesial temporal lobe abnormalities, particularly in the amygdala, with extension posteriorly through the hippocampus, as well as mild cortical atrophy. An EEG demonstrated left frontal polar and bitemporal epileptiform discharges but no electrographic seizures. A lumbar puncture revealed an opening pressure of 156 mm H₂O, 2 WBC/ μ l, 0 RBC/ μ l, protein 44 mg/dl, and glucose 65 mg/dl. CSF cytology and flow cytometry were negative, and there were no oligoclonal bands. ¹²⁵I- α -dendrotoxin RIA for VGKC antibodies in serum was positive (0.19 nmol/L, upper limit of normal 0.02 nmol/L). CSF PCR was negative for West Nile virus, *Tropheryma whipplei*, and arboviruses. Serum vitamin B12 level was normal and the following antibodies were negative: ANA, SSB, ds-DNA, RNP, Scl 70, and Jo-1. Elevated SSA/Ro antibodies (3 units, upper limit of normal 0.9 units) were noted in serum; complement C3/C4 was within normal limits. Tumor markers CEA, CA19-9, CA125, alpha-fetoprotein, beta-hCG, and paraneoplastic antibodies (Hu, Ma2, CRMP5, amphiphysin, Yo, Ri) were all negative. CT and FDG-PET did not reveal a neoplasm. Nerve conduction velocities showed no evidence of polyneuropathy, and needle EMG showed no evidence of PNH.

One month following this evaluation, he presented with a cluster of 3 generalized tonic-clonic seizures, including one lasting 20 minutes, followed by non-convulsive status epilepticus. His seizures were controlled with lorazepam, levetiracetam, valproic acid, and phenytoin. Repeat CSF and brain MRI studies were unchanged. A 5-day course of methylprednisolone (1 g daily) was initiated, with marked improvement in his cognitive function. He was slowly tapered from prednisone 60 mg to 40 mg, which led to increased confusion. Prednisone 60 mg was reinitiated, with some improvement in mental function. In an effort to decrease his steroid dependence, he was initiated on weekly rituximab for a 4-week cycle. At the last visit (3 months after rituximab), he was seizure-free for over 6 months and was able to fluently converse, balance a check book, and independently manage his daily affairs. His chief concern was continuing difficulty recalling events from several years ago.

Identification of Caspr2 as a target autoantigen

The serum and the CSF from the index case reacted with a neuronal surface antigen expressed on live, non-permeabilized rat hippocampal neurons (data not shown) that was precipitated and characterized by mass spectrometry as Caspr2.¹ Subsequently, HEK293 cells transfected to express human Caspr2 were used as a diagnostic assay that confirmed the presence of Caspr2 antibodies in the index patient (Figure 1), and served to identify 7 additional cases among the indicated cohort of patients (Table 1). These 7 patients' sera did not react with nontransfected cells, cells transfected with the voltage-gated potassium channel subunits Kv1.1 and Kv1.4, or cells transfected with LGI1 (data not shown).

Patients' antibodies react with peripheral nerve and co-localize with the juxtaparanodal expression of Caspr2

Since Caspr2 is concentrated at the juxtaparanodal region of myelinated axons⁷ and the sera of some patients with antibodies previously attributed to VGKC labeled myelinated axons,¹⁰ we examined whether patients' antibodies co-localized with Caspr2 at the juxtaparanodal region of mouse sciatic nerve fibers. The patients' serum and CSF, but not those from controls, robustly stained the juxtaparanodal regions of myelinated fibers in a pattern that overlapped with that of Caspr2 (Supplementary Figure 1). Patients' antibodies bound to Caspr2 at the juxtaparanodal region were labeled by a secondary anti-human-IgG antibody but not a secondary anti-human-IgM antibody, indicating that they are of the IgG type (data not shown).

Caspr2 is the target autoantigen in brain and nerve

We next used two different approaches to demonstrate that the reactivity of patients' antibodies with brain and nerve is directed against Caspr2. First, we immunoabsorbed a patient's CSF with Caspr2, and found that this specifically abrogated the reactivity of patient's antibodies with brain and peripheral nerve (Figure 2). As a further test we immunostained brains and teased nerve fibers from *Caspr2*-null mice and their wild-type littermates. Patients with co-existing antibodies to other antigens (AChR, MuSK, GAD) were excluded from this analysis (#2 and #4). These studies showed that sera from the remaining 5 patients immunostained the neuropil of brain in a pattern expected for Caspr2 (Figure 3). Similar experiments with peripheral nerve showed that patients' sera also labeled the juxtaparanodes of myelinated peripheral nerve fibers of wild-type mice in a pattern expected for Caspr2 reactivity (Figure 4). In contrast, these patterns of reactivity were not seen in *Caspr2*-null mice, indicating that the immunostaining was due to specific Caspr2 antibodies (Figures 3 and 4). Peripheral nerve fibers of wild-type and *Caspr2*-null mice were co-stained with a monoclonal antibody to the paranodal protein CASPR, which is related to Caspr2.⁹ CASPR staining did not co-localize with patients' antibody staining and was unchanged in *Caspr2*-null mice, further confirming the specificity of patients' antibodies for Caspr2.

Characteristics of patients with Caspr2 antibodies

The clinical characteristics of the patients with Caspr2 antibodies are described in Tables 1 and 2. Five patients had symptoms involving both the CNS (encephalitis, seizures) and PNS (hyperexcitability, neuropathy, thermal allodynia). Two additional patients had a purely CNS syndrome. Only one patient (#3) had acquired neuromyotonia without CNS symptoms. Two patients (#2 and #4) had bulbar weakness consistent with myasthenia gravis, and other autoantibodies against the skeletal muscle AChR and/or MuSK. One of these patients (#2) was described in a case report prior to the identification of Caspr2 antibodies.¹¹ Case #7 had severe progressive bulbar weakness but was not evaluated for myasthenia. A diagnosis of motor neuron disease was initially considered in these 3 patients (#2, #4, and #7).

Of the 5 patients with CNS symptoms who had brain MRI, 2 had T2 hyperintensities affecting the medial temporal lobes, 1 developed generalized atrophy, and 2 were normal. EEG studies of these 5 patients showed focal epileptiform activity in 3, diffuse slowing in 1, and no abnormality in 1. Of the 5 patients with PNS symptoms who had EMG/NCS studies, 4 had electrophysiological evidence of PNH, and 1 (who only had transient thermal allodynia) had a normal study.

Six of 7 patients tested for VGKC antibodies using the ¹²⁵I- α -dendrotoxin RIA had positive results, although none of them recognized HEK293 cells transfected with VGKC subunits (data not shown). None of the patients had a tumor except for past history of low-grade

bladder cancer in the index case. Seven patients improved with immunotherapy and were either healthy or only mildly disabled at the last follow-up (median 8 months, range 6–84 months). The patient with poor outcome (# 7) had progressive bulbar weakness, never received immunotherapy, and was lost to follow-up after 7 years.

Other groups of patients

Among the groups of patients studied, Caspr2 antibodies were not identified in 2 of 6 patients with Morvan's syndrome, 17 of 18 patients with acquired PNH, and 13 of 15 patients with encephalitis associated with atypical antibodies against the neuropil of hippocampus. None of the 49 patients with limbic encephalitis and antibodies attributed to VGKC had Caspr2 antibodies; however they all had Lgi1 antibodies. Two patients with PNH and one patient with Morvan's syndrome without Caspr2 or Lgi1 antibodies had a positive ^{125}I - α -dendrotoxin RIA, suggesting they had antibodies against other components of the VGKC-protein complex.

Discussion

This study demonstrates that Caspr2 is a brain and peripheral nerve autoantigen in a subgroup of disorders previously attributed to VGKC antibodies, including encephalitis, peripheral nerve dysfunction, or a combination of both (Morvan's syndrome). Symptoms may include cognitive impairment, memory loss, hallucinations, delusions, seizures, PNH, and axonal sensorimotor neuropathy. The presence of other autoantibodies may result in a complex syndrome with clinical and electrophysiological features suggesting a motor neuron disorder. Three different sets of experiments establish Caspr2 as an autoantigen of these disorders, 1) specific immunostaining of HEK293 cells expressing Caspr2 with serum or CSF of patients, 2) specific abrogation of patients' serum or CSF antibody reactivity after immunoabsorption with Caspr2-expressing cells, and 3) comparative brain and nerve immunostaining of wild-type and *Caspr2*-null mice, demonstrating lack of reactivity of patients' serum and CSF with *Caspr2*-null mice.

Caspr2 has a critical role in concentrating VGKCs and other proteins in the juxtaparanodal region of myelinated axons in both the PNS and the CNS.^{9, 12} One patient with homozygous deletion of *CNTNAP2* (OMIM 604569), the human gene that encodes Caspr2, had history of seizures and developed over 6 months progressive painful peripheral neuropathy and neuromyotonia to the point that it interfered with the patient's gait (K Strauss, unpublished data). However, knockout mice with disruption of the murine homolog encoding Caspr2⁷ had normal peripheral nerve conduction, suggesting that in patients with genetic or autoimmune disruption of Caspr2 the occurrence of peripheral neuropathy may be due to the involvement of other proteins that interact with Caspr2. Caspr2 is also expressed in the hippocampus,¹³ and mutations and polymorphisms of *CNTNAP2* have been linked to schizophrenia, psychosis, intractable focal seizures, autism, mental retardation, and cortical dysplasia.^{6 14–16} In this respect, the CNS symptoms of patients with antibodies to Caspr2 recapitulate some of the clinical features of genetic disruption of the gene. In one patient with mutated *CNTNAP2* the resemblance of symptoms with "VGKC-antibody associated encephalitis" led his neurologist to suspect this disorder (S. Markx, unpublished observation). Subsequent testing for VGKC antibodies using ^{125}I - α -dendrotoxin RIA as well as for Caspr2 antibodies resulted to be negative. We examined 20 additional patients with *CNTNAP2* mutations or polymorphisms and all were negative for Caspr2 antibodies.

Juxtaparanodal immunostaining of peripheral nerve by sera of patients with PNH has been previously attributed to antibodies against VGKC.¹⁰ Our data show that an actual antigenic target is Caspr2. Other investigators recently confirmed that Lgi1 is a major CNS target of VGKC complex-binding autoantibodies, and independently reported the paranodal protein

Caspr2 as a second antigenic target.¹⁷ In clinical practice the diagnosis of patients with Caspr2 antibodies can be more complicated than that of patients with classical limbic encephalitis and Lgi1 antibodies. This is due to the frequent occurrence of Caspr2 with other autoantibodies resulting in a complex disorder that can manifest with motor weakness, atrophy, fasciculations, and bulbar symptoms, leading to suspect an irreversible motor neuron disorder (see pictures and detailed information of case #2 in¹¹). Yet, this patient and most patients of the current study had dramatic responses to immunotherapy. It has been suggested that Caspr2 antibodies often occur in association with tumors (mostly thymoma) but our study shows otherwise.¹⁷ Extensive tumor screening, sometimes with a long follow-up, did not reveal a tumor in most patients, an observation that is emphasized by our referral pattern that likely favors patients with paraneoplastic disorders.

Our findings help to clarify the perplexing diversity of symptoms in patients previously diagnosed with VGKC antibodies. We suspect that other components of the Lgi1 or Caspr2 protein complex may be target antigens in other subgroups of patients pending characterization. For example, Lgi1 is a neuronal secreted protein that interacts with pre- and post-synaptic proteins, organizing a trans-synaptic protein complex with multiple components.¹⁸ There are cases of epilepsy or rapidly progressive dementia, different from limbic encephalitis, reported in association with antibodies to VGKC.¹⁹ It is unclear whether in these cases the target antigen is Lgi1, Caspr2, or another cell surface protein. Since only 1 of 18 patients with acquired PNH had Caspr2 antibodies and another 2 had positive ¹²⁵I- α -dendrotoxin RIA, other autoantigens may account for the majority of these cases.

Additional work is required to clarify the pathogenic mechanisms of autoantibodies to Caspr2, and determine how they may cause central and peripheral nerve dysfunction. Based upon the response of most patients with Caspr2 antibodies to immunotherapy and what is known about the direct effects of other cell surface antibodies on the target antigens,^{20–22} functional disruption of Caspr2, as opposed to neuronal destruction, is a likely mechanism.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgments

This work was supported by (RO1CA89054-06A2 and 1RC1NS068204) to JD, (NIH NS43174) to SSS, (NINDS NS50220, and the Israel Academy of Sciences) to EP, and a Dana Foundation Neuro-immunology Award to EL. We thank the physicians who provided clinical information. We also thank the patients and their families.

References

1. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, et al. Investigation of Lgi1 as the antigen of limbic encephalitis previously attributed to potassium channels. *Lancet Neurol.* 2010; 9:776–785. [PubMed: 20580615]
2. Buckley C, Oger J, Clover L, et al. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol.* 2001; 50:73–78. [PubMed: 11456313]
3. Tan KM, Lennon VA, Klein CJ, et al. Clinical spectrum of voltage-gated potassium channel autoimmunity. *Neurology.* 2008; 70:1883–1890. [PubMed: 18474843]
4. Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain.* 2005; 128:1764–1777. [PubMed: 15888538]
5. Bushara KO, Goebel SU, Shill H, et al. Gluten sensitivity in sporadic and hereditary cerebellar ataxia. *Ann Neurol.* 2001; 49:540–543. [PubMed: 11310636]
6. Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, et al. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med.* 2006; 354:1370–1377. [PubMed: 16571880]

7. Poliak S, Salomon D, Elhanany H, et al. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol.* 2003; 162:1149–1160. [PubMed: 12963709]
8. Brown AA, Xu T, Arroyo EJ, et al. Molecular organization of the nodal region is not altered in spontaneously diabetic BB-Wistar rats. *J Neurosci Res.* 2001; 65:139–149. [PubMed: 11438983]
9. Poliak S, Gollan L, Martinez R, et al. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron.* 1999; 24:1037–1047. [PubMed: 10624965]
10. Kleopa KA, Elman LB, Lang B, et al. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K⁺ channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain.* 2006; 129:1570–1584. [PubMed: 16613892]
11. Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Gallardo E, et al. Antibodies to AChR, MuSK and VGKC in a patient with myasthenia gravis and Morvan's syndrome. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007; 3:405–410. [PubMed: 17611489]
12. Scherer SS, Arroyo EJ. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst.* 2002; 7:1–12. [PubMed: 11939347]
13. Bel C, Oguievetkaia K, Pitaval C, et al. Axonal targeting of Caspr2 in hippocampal neurons via selective somatodendritic endocytosis. *J Cell Sci.* 2009; 122:3403–3413. [PubMed: 19706678]
14. Alarcon M, Abrahams BS, Stone JL, et al. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet.* 2008; 82:150–159. [PubMed: 18179893]
15. Friedman JI, Vrijenhoek T, Markx S, et al. CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy. *Mol Psychiatry.* 2008; 13:261–266. [PubMed: 17646849]
16. Zweier C, de Jong EK, Zweier M, et al. CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in Drosophila. *Am J Hum Genet.* 2009; 85:655–666. [PubMed: 19896112]
17. Irani SR, Alexander S, Waters P, et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain.* July 27.2010 10.1093/brain/awq213
18. Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, et al. Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:3799–3804. [PubMed: 20133599]
19. Geschwind MD, Tan KM, Lennon VA, et al. Voltage-gated potassium channel autoimmunity mimicking creutzfeldt-jakob disease. *Arch Neurol.* 2008; 65:1341–1346. [PubMed: 18852349]
20. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2008; 7:1091–1098. [PubMed: 18851928]
21. Lai M, Hughes EG, Peng X, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol.* 2009; 65:424–434. [PubMed: 19338055]
22. Lancaster E, Lai M, Peng X, et al. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol.* 2009; 9:67–76. [PubMed: 19962348]

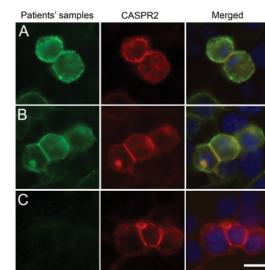


Figure 1. Patients' antibodies react with cells expressing Caspr2

HEK cells were transiently transfected to express human Caspr2, and labeled with the index patient's CSF (A; green) or serum from a different patient (B; green) and a rabbit antibody to Caspr2 (A, B red), and counterstained with DAPI. Merged images (A, B yellow) demonstrate the overlap of patients' antibody staining with Caspr2 expression. CSF (C) from a control patient did not react with cells expressing Caspr2. Scale bar: 20 μ m

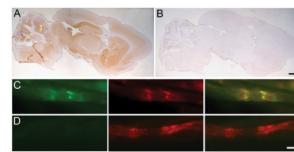


Figure 2. Immunoabsorption with Caspr2 abrogates the reactivity of the index patient's antibodies with rodent brain and peripheral nerve

Top row: Rat brain sections were immunolabeled with the CSF of the index patient after immunoabsorption with sham transfected HEK cells (A) or HEK cells transfected to express Caspr2 (B); scale bar: 300 μ m. Bottom rows: Teased mouse sciatic nerve fibers were immunolabeled with the CSF (green) of the index patient after immunoabsorption with sham transfected HEK cells (C) or HEK cells transfected to express Caspr2 (D); a rabbit antibody against Caspr2 (red) labels the endogenous Caspr2. Note that the reactivity of the patient's CSF for both brain and teased fibers is abrogated when the CSF is preabsorbed with Caspr2. Scale bar: 10 μ m.

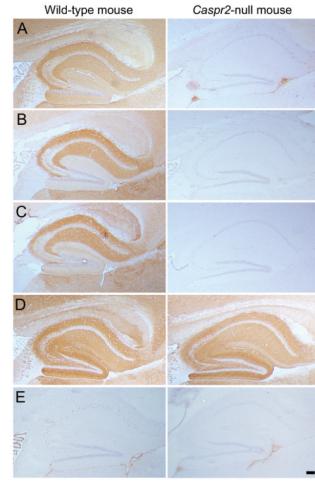


Figure 3. Patients' antibodies react with wild-type but not *Caspr2*-null mouse brains

The CSF (A) and serum (B) from 2 different patients with Caspr2 antibodies immunostain the hippocampus of a wild-type mouse in a pattern identical to that obtained with a rabbit polyclonal antibody against Caspr2 (C). This staining is not seen in sections from a *Caspr2*-null mouse (A-C, columns on the right). The pattern of staining with a CSF from a patient with limbic encephalitis associated with LGI1 antibodies is subtly different from Caspr2 and it is not affected using wild-type or *Caspr2*-null mice (D). The CSF of a control individual without Caspr2 or LGI1 antibodies does not label either sample (E). Scale bar: 100 μ m

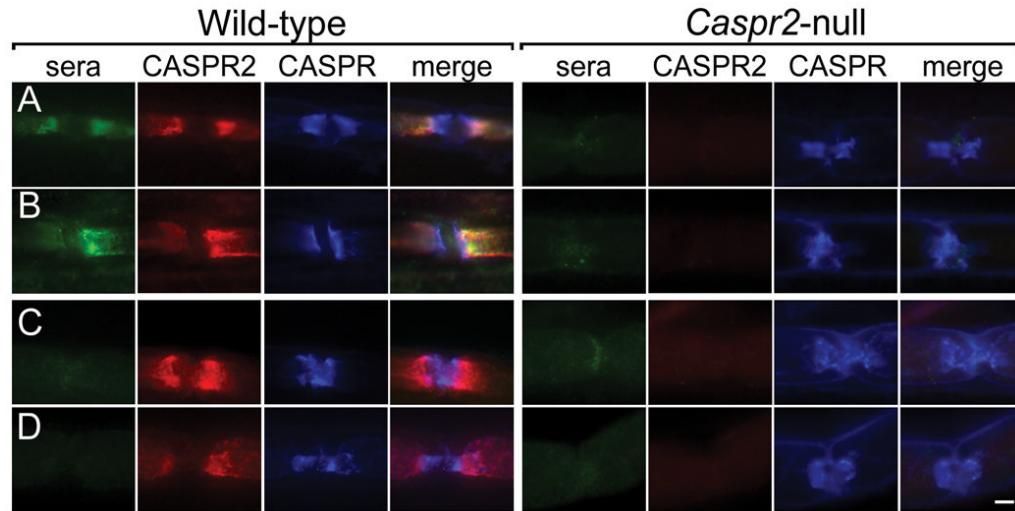


Figure 4. Patients' antibodies label teased fibers from wild-type but not *Caspr2*-null nerves
The sera (green) of 2 patients with *Caspr2* antibodies (A and B) immunolabel the juxtaparanodes of teased sciatic nerve fibers from wild-type mice in a pattern similar to that of a rabbit antibody against *Caspr2* (red), but different than the paranodal staining seen with a mouse monoclonal against *CASPR* (blue). In contrast, neither these patients' sera nor the rabbit antibody against *Caspr2* label teased sciatic nerve fibers from *Caspr2*-null mice (columns on the right). Sera from 2 controls (C and D) do not label teased nerve fibers.
Scale bar is 5 μ m.

Demographic and clinical features

Table 1

Patient	Age	Sex	Symptoms/signs	Other clinical and immunological features
1	68	Male	3 years of thermal allodynia, 2 years of intermittent complex partial seizures, and 1 year of progressive memory difficulties	VGKC antibodies [†] CSF: 2 WBC/µL, protein 44 mg/dL, glucose 65 mg/dL. Oligoclonal bands negative
2	46	Female	2 years of progressive fatigue, personality changes, increased sweating, dysphagia with substantial weight loss, dysarthria, and intermittent ptosis and diplopia. Progressed to prolonged respiratory failure, visual hallucinations, and delusions of persecution	Diagnosed with myasthenia gravis MUSK antibodies 89 nmol/L (normal <0.5) AChR antibodies 247 nmol/L (normal <0.5) VGKC antibodies [†]
3	66	Male	1 year of progressive lower extremity cramps, worse with exercise and sensory predominant polyneuropathy	VGKC antibodies not detected [†]
4	52	Male	5 years of progressive encephalopathy, myokymia and weakness. Progressed to critical illness with seizures, severe bulbar weakness, and encephalitis	VGKC antibodies [†] GAD65 antibodies, AChR antibodies, SIADH, peripheral neuropathy (type 1 diabetes)
5	77	Male	1 year of 70 pounds weight loss, diffuse sweating, twitching of hands and feet. Progressed to severe jerking at night, even during sleep, difficulty walking, falls, difficulty concentrating, confusion, and psychomotor slowing	VGKC antibodies [†] Serum sodium 129 mmol. CSF: no cells, protein 34 mg/dL, glucose 58 mg/dL
6	60	Male	Agitation, amnestic periods, seizures. No peripheral nervous system symptoms	VGKC antibodies not tested CSF: 4 WBC/µL, protein 35 mg/dL, glucose 75 mg/dL. Elevated PSA negative prostate biopsy, negative PET scan and CT of abdomen and pelvis
7	61	Male	Myokymia, fasciculations, cramps, involuntary lingual movements. Developed seizures and encephalitis after 1 year. Progressive dysphagia, dysarthria, myoclonus and ataxia after 6 years	VGKC antibodies [†] CSF: 15 WBC/µL, normal protein and glucose
8	59	Male	Generalized seizures and severe amnestic syndrome	VGKC antibodies [†]

[†]VGKC antibodies detected by the ^{125}I -α-dendrotoxin RIA; normal values differed in different laboratories. CSF: cerebrospinal fluid.

Table 2

Imaging, clinical electrophysiology, treatment, and outcome

Patient	Brain MRI	EEG	EMG/NCS	Treatments	Outcome (duration of follow-up)
1	Bilateral increased T2 signal involving mesial temporal lobes, and mild cortical atrophy	Left frontal polar and bitemporal epileptiform discharges but no electrographic seizures	Normal motor and sensory responses (aside from median neuropathy at the wrist). No evidence of peripheral nerve hyperexcitability	Corticosteroids, rituximab	Improving cognition; mild residual memory deficits; seizures controlled with antiepileptics (6 months)
2	Normal	-	Normal motor and sensory nerve conduction studies. Needle EMG showed spontaneous motor unit discharges and fibrillation potentials, but no neuromyotonia. Repetitive stimulation was normal	Prednisone, cyclosporine, thymectomy, rituximab	All symptoms resolved. Mental status normal (5 years)
3	-	-	Decreased sensory and motor amplitudes, normal conduction velocities, fasciculations, 5–150 Hz spontaneous motor unit discharges, increased motor unit duration, amplitude, and polyphasic motor units.	carbamazepine, amitriptyline, pregabalin (all for peripheral nerve hyperexcitability).	Mild disability from continuing sensory-motor polyneuropathy and cramps (4 years).
4	Normal	Mild diffuse background slowing		Methylprednisolone, plasma exchange, IVIG, low-dose cyclophosphamide, rituximab	Markedly improved cognition, seizures controlled, bulbar weakness improved (6 months)
5	Age-appropriate atrophy	Normal	At presentation: myokymia, fasciculations, chronic and acute denervation. After one month of treatment: marked improvement of myokymia, no signs of denervation	Corticosteroids, plasma exchange	Cognitive symptoms persist (not oriented to time), improving muscle movements (12 months)
6	T2 increased intensities affecting left medial temporal lobe	Focal slowing and sharp waves over left temporal region		methylprednisolone	Recovered from seizures and memory deficits; mild mood instability (6 months)
7	At presentation: normal. At 2 years: diffuse cortical and subcortical atrophy	Right temporal sharp waves	At presentation: normal. At 5 years: normal NCS, diffuse fasciculations, normal motor unit morphology. At 7 years: normal sensory responses, decreased motor amplitudes, normal conduction velocities, wide-spread fasciculations, fibrillation potentials, and 5–150 Hz motor unit discharges	None	Lost to follow-up after 7 years of worsening symptoms.
8	Normal	-	-	IVIG (6 monthly cycles)	Normal (6 months)

