



Instituto de  
Investigación  
Sanitaria La Fe



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Instituto de Investigación Sanitaria del  
Hospital Universitario y Politécnico La Fe.  
Universidad de Valencia.

ESTUDIO DE ANTICUERPOS FRENTE  
ANTÍGENOS DE MEMBRANA NEURONAL EN  
SÍNDROMES NEUROLÓGICOS CON  
HIPEREXCITABILIDAD MOTORA.

Presentada por:

Estefanía Torres Vega

Programa de Doctorado de Neurociencias de la Universidad de Valencia  
(RD 1393/2007)

Director: Dr. Luis Bataller Alberola

Codirector: Dr. José Manuel García Verdugo

Valencia, España

Marzo, 2017



Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital  
Universitario y Politécnico La Fe  
Universidad de Valencia.  
Dr. José María Millán Salvador  
DIRECTOR

## A QUIEN CORRESPONDA

El Dr. José María Millán Salvador, director científico del Instituto de Investigación sanitaria del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, centro colaborador con la Universidad de Valencia (UV) y la Universidad Politécnica de Valencia (UPV)

CERTIFICA,

Que la Tesis Doctoral titulada: “Estudio de anticuerpos frente antígenos de membrana neuronal en síndromes neurológicos con hiperexcitabilidad motora” ha sido realizada por Dña. Estefanía Torres Vega, Licenciada en Biología, bajo la dirección del Dr. Luis Bataller Alberola, y da su conformidad para que se presente la tesis a la Comisión de Doctorado de la Universidad de Valencia.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expide y firma el presente Certificado en Valencia a 21 de Marzo de 2017.



Fdo. José María Millán Salvador



Instituto de  
Investigación  
Sanitaria La Fe



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital  
Universitario y Politécnico La Fe  
Universidad de Valencia.

A QUIEN CORRESPONDA,

El Dr. Luis Bataller Alberola, Neurólogo e Investigador del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, centro colaborador con la Universidad de Valencia (UV) y la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), y el Dr. José Manuel García Verdugo, catedrático de Biología Celular de la Universidad de Valencia (UV) e Investigador del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva

CERTIFICAN,

Que Dña. Estefanía Torres Vega, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge en su Tesis Doctoral titulada “Estudio de anticuerpos frente antígenos de membrana neuronal en síndromes neurológicos con hiperexcitabilidad motora”.

Que han revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo y dan su conformidad para que se presente la tesis a la Comisión de Doctorado de la Universidad de Valencia.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden y firman el presente Certificado en Valencia a 21 de Marzo de 2017.

Fdo. Luis Bataller Alberola

José Manuel García Verdugo

## **Agradecimientos**

Muchas personas han contribuido a que haya podido llegar a este momento, desde mis profesoras de Biología del colegio e instituto, que consiguieron que me diera cuenta muy pronto de mi pasión por la Ciencia y la Biología Molecular, hasta el Dr. José Manuel García Verdugo, que no solo es un científico y profesor admirable sino también una gran persona con la que siempre he podido contar.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Luis Bataller Alberola por darme la oportunidad de formar parte de su proyecto, por su continua guía y dedicación. Gracias por todas las horas que has sacado de donde no se podía. En segundo lugar, agradecer a la Dr. Nuria Mancheño y a todo su equipo de Anatomía Patológica por toda la ayuda prestada para la realización de este trabajo. También a mis compañeros Patri, Susana, María, Arantxa, Paula, Vicente, Jorge por vuestros consejos y apoyo personal.

Agradecer en especial, a Ana por compartir conmigo tantos momentos felices, a Carmen por todas las cosas que me ha enseñado, a Cuca y a toda mi familia por vuestro cariño e incesante apoyo durante estos años. Gracias a vosotros he aprendido muchas habilidades importantes que he necesitado para realizar este trabajo. De mi madre aprendí a seguir hacia delante, de mis abuelos a luchar por lo que quieres, de mi padre a que no importan las distancias para que tu familia te quiera como si no llevases fuera 10 años, de mi hermano David a superarme cada día, de mi tío Dari aprendí a no dejar las cosas para mañana, de mi tía Rosana que si algo no tenía solución no pasaba nada y de John aprendí algo muy importante: a compartir con una sonrisa. Lo siento por todo el tiempo que no he podido estar con vosotros, por todas las cosas que me he perdido. Solo quiero que sepáis que os quiero tanto a todos que no se puede escribir en ningún agradecimiento.

A mi familia



## ABREVIATURAS

<b>AChR</b>	Receptor de acetilcolina ( <i>Acetylcholine receptor</i> )
<b>ACN</b>	Acetonitrilo ( <i>Acetonitrile</i> )
<b>AIRE</b>	Regulador autoinmune ( <i>Autoimmune regulator</i> )
<b>AMPAR</b>	Receptor del ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico ( <i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i> )
<b>ANA</b>	Anticuerpo antinuclear ( <i>Antinuclear antibodies</i> )
<b>AQP4</b>	Acuaporina 4 ( <i>Aquaporin-4</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovine serum albumin</i> )
<b>Caspr2</b>	Proteína símil 2 asociada a contactina ( <i>Contactin-associated protein-like 2</i> )
<b>CV2/CRMP5</b>	Proteína mediadora de respuesta a la colapsina tipo 5 ( <i>Collapsin response mediator protein 5</i> )
<b>DAPI</b>	4'-6-diamino-2-fenilindol
<b>DCC</b>	Proteína eliminada en cáncer colorrectal ( <i>Deleted in colorectal carcinoma</i> )
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DPP</b>	Dipeptidilpeptidasa ( <i>Dipeptidyl-peptidase-like protein</i> )
<b>EDTA</b>	Etilenediaminatetaacético
<b>FA</b>	Ácido fórmico
<b>FOXP3</b>	Escurfina ( <i>Forkhead box P3</i> )
<b>GABAR a, b</b>	Receptor del ácido $\gamma$ -aminobutírico de tipo A, B ( <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid receptor type A, B</i> )
<b>GAD65</b>	Decarboxilasa de ácido glutámico, isoforma de 65KDa ( <i>Glutamate decarboxylase, 65KDa isoform</i> )
<b>GADPH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa ( <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> )
<b>GlyR</b>	Receptor de glicina ( <i>Glycine receptor</i> )
<b>GD1 a, b</b>	Disialogangliósido 1 a, b
<b>GM1</b>	Monosialogangliósido 1
<b>GQ1b</b>	Tetrasialogangliósido 1b
<b>HEK293T</b>	Células de riñón embrionarias humanas 293T ( <i>Human embryonic kidney cells 293 T</i> )
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitarios humanos ( <i>Human leukocyte antigen</i> )

<b>IgG, IgM</b>	Inmunoglobulina clase G, M
<b>IgLON5</b>	<i>IgLON family member 5</i>
<b>IL</b>	Interleuquina ( <i>Interleukin</i> )
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>LGI1</b>	Proteína 1 inactivada del glioma rica en leucina ( <i>Leucine-rich glioma inactivated protein 1</i> )
<b>Ma1,2</b>	Proteína 1,2 específica testicular y neuronal
<b>MAG</b>	Glicoproteína asociada a la mielina ( <i>Myelin-associated glycoprotein</i> )
<b>MG</b>	Miastenia gravis
<b>MGUS</b>	Gammapatía monoclonal de significancia indeterminada ( <i>Monoclonal gammopathy of undetermined significance</i> )
<b>mGluR1</b>	Receptor metabotrópico del glutamato tipo 1 ( <i>Metabotropic glutamate receptor 1</i> )
<b>mGluR5</b>	Receptor metabotrópico del glutamato tipo 5 ( <i>Metabotropic glutamate receptor 5</i> )
<b>MGD</b>	<i>Mouse genome database</i>
<b>MHC</b>	Moléculas de histocompatibilidad
<b>MOG</b>	Glicoproteína oligodendrocítica de la mielina ( <i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> )
<b>MOPS</b>	3-N-morfolino-propanosulfónico
<b>MuSK</b>	Receptor tirosinquinasa específico del músculo ( <i>Muscle-specific tyrosine kinase</i> )
<b>NCBI</b>	<i>National centre for biotechnology information</i>
<b>NMDAR</b>	Receptor del ácido N-metil-D-aspartato ( <i>N-methyl D-aspartate receptor</i> )
<b>NMT</b>	Neuromiotonía
<b>OMIM</b>	<i>Online mendelian inheritance in men database</i>
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffer saline</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PSD95</b>	Proteína de la densidad post-sináptica 95 ( <i>Post-synaptic density-95 protein</i> )
<b>PUM</b>	Potenciales de unidad motora
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
<b>SCLC</b>	Cáncer de pulmón de células pequeñas ( <i>Small-cell lung cancer</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SH-SY5Y</b>	Línea celular de neuroblastoma humano derivada tejido neural de médula ósea

<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOM</b>	Síndrome Opsoclonus-Mioclonus
<b>SOX1/AGNA</b>	Proteína relacionada con grupo de alta movilidad caja 1 de la región determinante del sexo del cromosoma Y ( <i>Sex determining region Y-related high mobility group box 1</i> )
<b>TCR</b>	Receptor de células T ( <i>T-cell receptor</i> )
<b>TFA</b>	Ácido trifluoro acético ( <i>Trifluoroacetic acid</i> )
<b>UNC5A</b>	<i>Netrin Uncoordinated-5-homolog A receptor</i>
<b>Uniprot</b>	<i>Universal protein resource database</i>
<b>Tr/PCA-Tr</b>	Anticuerpos frente a células de Purkinje tipo Tr ( <i>Purkinje cell antibody type Tr</i> )
<b>VGCC</b>	Canales de calcio dependientes de voltaje ( <i>Voltage-gated calcium channels</i> )
<b>VGKC</b>	Canales de potasio dependientes de voltaje ( <i>Voltage-gated potassium channels</i> )
<b>VPP</b>	Valor predictivo positivo
<b>Yo/PCA1</b>	Anticuerpos frente a células de Purkinje tipo 1 ( <i>Purkinje cell antibody type 1</i> )
<b>Zic4</b>	Proteína de dedo de zinc del cerebelo tipo 4 ( <i>Zinc finger protein of cerebellum 4</i> )



## ÍNDICE

### INTRODUCCIÓN

<b>1. Concepto de autoinmunidad.</b>	3
<b>2. Tolerancia inmunitaria y pérdida de la tolerancia.</b>	6
<b>3. Síndromes neurológicos autoinmunes.</b>	14
3.1 Esclerosis múltiple.	15
3.2 Neuropatías periféricas agudas y crónicas.	17
3.3 Miastenia gravis y trastornos asociados.	20
<b>4. Encefalitis autoinmunes. Síndromes neurológicos paraneoplásicos.</b>	21
<b>5. Patogenia de las enfermedades con anticuerpos frente a antígenos intracelulares.</b>	26
<b>6. Patogenia de las enfermedades con anticuerpos frente a antígenos de superficie.</b>	30
6.1 Miastenia gravis.	30
6.2 Encefalitis autoinmunes con anticuerpos anti-NMDAR.	32
<b>7. Síndrome Opsoclonus-Mioclonus.</b>	34
<b>8. Neuromiotonía.</b>	42
9.1. Teorías sobre mecanismos de rotura de tolerancia relacionados con el timoma.	55

### OBJETIVOS

<b>1. Objetivo general.</b>	61
<b>2. Objetivos en las enfermedades objeto de estudio.</b>	61
2.1 Síndrome opsoclonus-mioclonus .	61
2.2 Neuromiotonía.	61
2.3 Timoma.	62

### MATERIAL Y MÉTODOS

<b>1. Pacientes y controles utilizados.</b>	65
1.1 Pacientes y controles utilizados para los estudios de SOM.	65
1.1.1 Criterios clínicos de inclusión de los pacientes con SOM.	65
1.2 Pacientes y controles utilizados para los estudios de NMT	66
1.2.1 Criterios clínicos y electromiográficos de inclusión de pacientes con NMT y MG.	67
1.3 Muestras de tejido tímico para los estudios inmunohistoquímicos.	68
1.4 Tratamiento de las muestras.	68
<b>2. Cultivo y mantenimiento de la línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y).</b>	68
<b>3. Estudios de reactividad inmunitaria.</b>	69
3.1 Inmunofluorescencia sobre células de neuroblastoma (SH-SY5Y).	69
3.2 Inmunofluorescencia sobre secciones sagitales de cerebro y cerebelo de rata.	71
3.3 Inmunofluorescencia sobre uniones neuromusculares de ratón cepa C57BL/6J.	72
3.4 Inmuno oro post-embedding con sueros de pacientes sobre células de neuroblastoma (SH-SY5Y).73	
<b>4. Purificación de sinaptosomas de rata.</b>	74
4.1 Western-blot de las fracciones del proceso de purificación de sinaptosomas.	75
4.2 Microscopía electrónica de las fracciones de sinaptosomas.	76
<b>5. Experimentos de inmunoprecipitación.</b>	77
5.1 Inmunoprecipitación con tejido nervioso.	78
5.2 Inmunoprecipitación con la línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y).	78
5.3 Inmunoprecipitación con sinaptosomas.	79
<b>6. Electroforesis desnaturalizante de las proteínas inmunoprecipitadas.</b>	79
<b>7. Análisis por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) y búsqueda en bases de datos</b>	80
<b>8. Análisis diferencial y funcional de las proteínas inmunoprecipitadas.</b>	82
<b>9. Estudios de ensayos con células.</b>	83

9.1	Obtención y purificación de DNA plasmídico.	83
9.2	Corte con enzimas de restricción y ligación del DNA plasmídico.	85
9.3	Ensayo por inmunofluorescencia con células de riñón embrionarias humanas (HEK293T) transfectadas.	87
<b>10.</b>	<b>Estudios inmunohistoquímicos sobre tejido tímico.</b>	<b>88</b>
<b>11.</b>	<b>Inmunoblots y medición de los niveles de anticuerpos anti-AChR.</b>	<b>91</b>
<b>12.</b>	<b>Estudios estadísticos.</b>	<b>91</b>
<b>RESULTADOS</b>		
<b>1.</b>	<b>Reactividad de los sueros de pacientes con SOM.</b>	<b>95</b>
1.1	Inmunofluorescencias contra la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.	95
1.2	Inmuno oro contra la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.	97
<b>2.</b>	<b>Validación del proceso de purificación de sinaptosomas utilizados en los experimentos de inmunoprecipitación.</b>	<b>99</b>
2.1	Western-blot de las fracciones del proceso de purificación.	99
2.2	Microscopía electrónica de las fracciones del proceso de purificación.	100
2.3	Inmunoprecipitación con sinaptosomas de la proteína NMDAR.	102
<b>3.</b>	<b>Inmunoprecipitaciones con sueros de pacientes con SOM.</b>	<b>103</b>
3.1	Inmunoprecipitación y preselección de proteínas identificadas.	103
3.2	Proteínas inmunoprecipitadas por sueros de pacientes con SOM y neuroblastoma.	105
3.2.1	Análisis funcional y bibliográfico de fenotipos mutantes de las proteínas de superficie inmunoprecipitadas por pacientes con SOM y neuroblastoma.	106
3.2.2	Inmunofluorescencias sobre células HEK293T transfectadas con canales de potasio.	110
3.3	Proteínas inmunoprecipitadas por sueros de pacientes con SOM idiopático.	112
3.3.1	Análisis funcional y bibliográfico de fenotipos mutantes de las proteínas inmunoprecipitadas por pacientes con SOM idiopático.	114
<b>1.</b>	<b>Reactividad de los sueros de pacientes con NMT.</b>	<b>117</b>
1.1	Inmunofluorescencias sobre secciones sagitales de cerebro y cerebelo de rata.	117
1.2	Inmunofluorescencias sobre uniones neuromusculares de ratón.	119
<b>2.</b>	<b>Inmunoprecipitaciones con sueros de pacientes con NMT.</b>	<b>121</b>
2.1	Proteínas inmunoprecipitadas por los sueros de pacientes con NMT.	121
2.1.1	Análisis funcional y bibliográfico de fenotipos mutantes de las proteínas de superficie inmunoprecipitadas por los sueros de pacientes con NMT.	122
<b>3.</b>	<b>Inmunofluorescencias sobre células HEK293T transfectadas con los candidatos antigénicos.</b>	<b>125</b>
3.1	Asociaciones clínicas en los pacientes seropositivos.	125
<b>4.</b>	<b>Estudio histológico de pacientes con tímoma y enfermedades de hiperexcitabilidad periférica.</b>	<b>139</b>
4.1	Expresión de los antígenos en el timo sano y en el tímoma de los pacientes.	150
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>155</b>
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>179</b>
<b>TABLAS ANEXAS</b>		<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>189</b>
<b>PUBLICACIONES</b>		<b>219</b>

# *INTRODUCCIÓN*



## 1. Concepto de autoinmunidad.

El sistema inmunitario, a través de una organización celular y molecular altamente especializada, tiene como función principal la defensa del cuerpo frente a una infección. Existen dos tipos de respuestas inmunitarias: innata y adaptativa (o adquirida). La respuesta innata sucede en las primeras etapas de infección, mediante diversos mecanismos naturales que responden ante la presencia de un patógeno (microorganismo capaz de producir una enfermedad cuando infecta un huésped). Los procesos de **inmunidad innata** carecen de memoria inmunitaria (la respuesta inmunitaria no aumenta tras exposiciones repetidas a un patógeno), son inespecíficos (la respuesta inmunitaria no discrimina entre un grupo de patógenos relacionados) y están presentes en todos los individuos durante toda la vida. Por otro lado, la **inmunidad adaptativa** es específica frente a un **antígeno** (cualquier molécula capaz de generar anticuerpos) y requiere el desarrollo de memoria inmunitaria. La consecuencia normal de una respuesta adaptativa frente a un antígeno extraño es la eliminación completa del antígeno del huésped. Por ejemplo, una célula infectada intracelularmente con un virus se elimina por células T citotóxicas (**respuesta celular**), en cambio los antígenos solubles se eliminan a través de la formación de complejos antígeno-anticuerpo (**respuesta humoral**).

Desgraciadamente, la respuesta inmunitaria adaptativa (humoral o celular) también puede estar dirigida contra **autoantígenos** (antígenos del propio cuerpo). Cuando se produce una respuesta inmunomediada adaptativa aberrante contra los propios tejidos u órganos sanos, hablamos de **enfermedad autoinmune**. Debido a la imposibilidad de los mecanismos efectoras para eliminar completamente el autoantígeno del huésped, se produce un daño crónico de los tejidos y órganos en ausencia de: infección, exposición a toxinas o crecimiento tumoral [1].

En 1957 el inmunólogo Ernst Witebsky estableció los siguientes criterios para considerar que una enfermedad es de origen autoinmune [2]:

- Presencia de autoanticuerpos o células T autorreactivas circulantes.
- Identificación del autoantígeno relacionado.
- Inducción de una respuesta autoinmune similar en animales de experimentación.
- Reproducción de los síntomas clínicos tras la inmunización de animales de experimentación.

En 1993 Rose y Bona actualizaron los postulados de Witebsky a los siguientes [3]:

- Evidencia directa de autoinmunidad: La transferencia de anticuerpos patogénicos de humano a humano (por ejemplo, el paso transplacentario de anticuerpos de la madre al feto), la transferencia de anticuerpos patogénicos o de células T patogénicas a modelos animales experimentales reproducen las características clínicas de la enfermedad autoinmune. Otra evidencia es la demostración *in vitro* de la destrucción del autoantígeno en células cultivadas.
- Evidencia indirecta de autoinmunidad: La inmunización activa o con modelos genéticamente inducidos reproduce las características clínicas de la enfermedad autoinmune.
- Evidencia circunstancial de autoinmunidad: Se basan en observaciones clínicas, como por ejemplo: la respuesta favorable a inmunoterapia, la asociación con otras enfermedades autoinmunes en el mismo paciente, la infiltración linfocítica o existencia de autoanticuerpos en el órgano diana, la expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC) relacionadas con autoinmunidad o la expresión aberrante de MHC de clase II presentadoras de antígenos en el órgano diana.

En la actualidad, se acepta el origen autoinmune de más de 80 enfermedades, entre ellas se encuentran: la artritis reumatoide, la diabetes mellitus tipo I, el lupus eritematoso sistémico, etc. Se estima que entre un 5-7% de la población está afectada por alguna enfermedad autoinmune y la incidencia de estas enfermedades está aumentando [4]. Las enfermedades autoinmunes se clasifican de acuerdo a sus características clínico-patológicas en:

- **Enfermedades autoinmunes órgano-específicas:** en las que los ataques autoinmunes se restringen a órganos específicos del cuerpo.
- **Enfermedades autoinmunes sistémicas:** en las que los ataques autoinmunes afectan a varios tejidos del cuerpo [1].

Cabe destacar que la respuesta inmunitaria en el sistema nervioso central (SNC) presenta algunas características especiales que la diferencian de lo que normalmente ocurre en otros órganos o tejidos. En primer lugar, el SNC está aislado anatómicamente a través de la barrera hematoencefálica, la cual está compuesta por: células endoteliales de los capilares, pies terminales de los astrocitos, pericitos y microglia. Por consiguiente, esta barrera es altamente selectiva para la difusión paracelular de iones, solutos, agua, proteínas y linfocitos [5], al mismo tiempo que restringe el acceso de anticuerpos (a menos del 1% de los niveles circulantes) [6]. En segundo lugar, en el SNC sano hay un número bajo de células presentadoras de antígenos y las células que pueden presentar antígenos y desencadenar una respuesta inmunitaria generalmente expresan bajos niveles de MHC [7]. Por último, el SNC carece del clásico sistema de drenaje linfático [8], exceptuando el reciente descubrimiento de vasos linfáticos funcionales que revisten los senos duros [9].

Pese a que el SNC clásicamente ha sido considerado como un sitio “inmunoprivilegiado”, numerosas investigaciones evidencian la existencia de una comunicación bidireccional entre el SNC y el sistema inmunitario. Por ejemplo, un

tejido trasplantado en el SNC sufre rechazo cuando se coloca un segundo trasplante subcutáneo en el mismo animal [10]. Actualmente, la barrera hematoencefálica se considera una barrera dinámica e interactiva. La permeabilidad de la barrera hematoencefálica está regulada de un modo estrictamente controlado para permitir el paso de células inmunitarias durante condiciones patológicas, como: las infecciones virales o bacterianas, los procesos isquémicos o inflamatorios. Durante estos procesos patológicos, la activación de células gliales (astrocitos y microglia) modifica la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y permite reclutar células inmunitarias circulantes. Por tanto, el SNC es capaz de mantener una continua inmunovigilancia a través de interconexiones celulares complejas. Cuando los mecanismos de inmunovigilancia fallan, se pueden producir respuestas aberrantes en el sistema nervioso, como: los procesos inflamatorios o de autoinmunidad [7, 11].

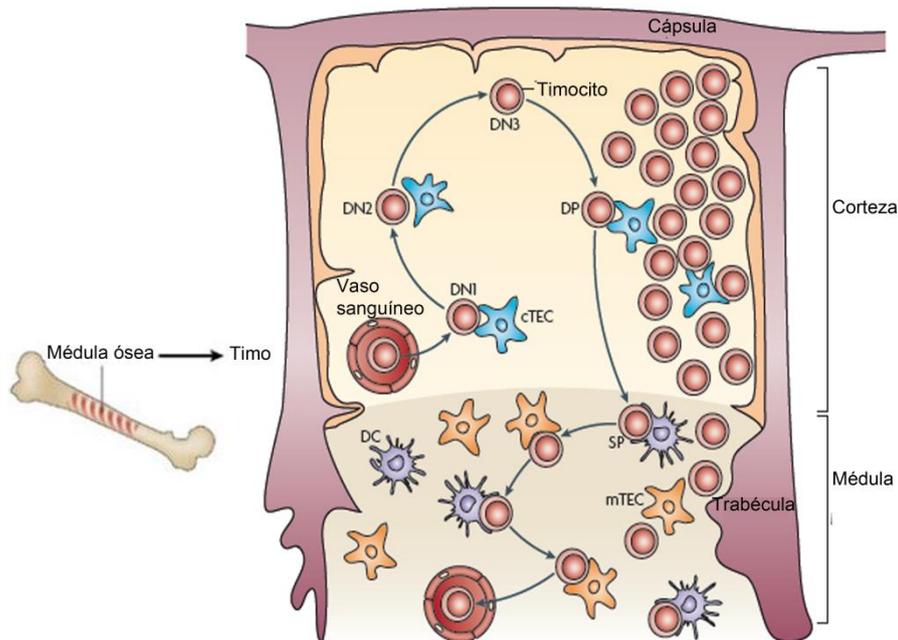
## **2. Tolerancia inmunitaria y pérdida de la tolerancia.**

La capacidad para responder a un antígeno específico, ya sea propio o extraño, se denomina **tolerancia inmunitaria**. Aunque existen mecanismos de autoinmunidad fisiológica, como los anticuerpos anti-idiotipo que se unen al sitio de unión con el antígeno de otros anticuerpos en individuos sanos, normalmente, la rotura de la autotolerancia inmunitaria conduce a la aparición de enfermedades autoinmunes [12].

La tolerancia inmunitaria se mantiene mediante: un proceso de control central de la generación de células B y T autorreactivas en los órganos linfoides primarios (médula ósea y timo respectivamente) y un proceso de control periférico de la activación, la expansión y supervivencia de las células autorreactivas.

El mecanismo principal de tolerancia central es el proceso de **delección clonal**, esto es, la destrucción de células T y B autoreactivas en órganos linfoides primarios.

Las células T inmaduras (timocitos) derivadas de progenitores de la médula ósea migran a la corteza del timo. Si no reciben una señal de supervivencia a los tres o cuatro días de su migración, los timocitos están programados para ser eliminados. Esta señal se basa en la comprobación de la capacidad del receptor de células T (TCR) de los timocitos para reconocer los péptidos presentados por las MHC en las células epiteliales corticales. La finalidad de esta fase, conocida como **selección positiva**, es regular la expresión del TCR y diferenciar las células T en células T maduras que expresen CD8 o CD4 en su superficie (dependiendo de si reconocen péptidos unidos a MHC de clase I o péptidos unidos a MHC de clase II, respectivamente) [13]. Aproximadamente un 95% de las células no tienen la suficiente afinidad para generar una transducción de la señal y mueren por apoptosis. Las células que sobreviven migran a la médula del timo, donde sucede el proceso de **selección negativa**. En este proceso las células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que reaccionan con gran afinidad por autopéptidos mueren por apoptosis. En la médula del timo, las células dendríticas expresan altos niveles de MHC de clase I y II y presentan: proteínas ubicuas de membrana o intracelulares, proteínas circulantes del suero y las células epiteliales medulares tímicas actúan como presentadoras de autoantígenos que se expresan promiscuamente [13, 14]. Algunos autores creen que en la corteza las células T reciben una señal letal pero la apoptosis no sucede hasta que las células migran a la médula y contactan con células presentadoras de antígenos [15]. El proceso de selección de células T en el timo puede verse en la **Figura 11**.



**Figura II.- Mecanismo de tolerancia central de células T.** Los progenitores de células T procedentes de la médula ósea entran en el timo a través de vasos sanguíneos en la unión cortico-medular. Los timocitos doble negativos (DN) se mueven hacia la zona subcapsular. Tras la selección del receptor de células T, las células doble positivas (DP) migran a través de la corteza escaneando ligandos de selección positiva en las células epiteliales tímicas corticales (cTECs). Tras la selección positiva del linaje CD4 o CD8 los timocitos positivos (SP) migran hacia la médula donde escanean células presentadoras de antígenos medulares (la mayoría células dendríticas [DCs] o células epiteliales tímicas medulares maduras [mTECs] que expresan promiscuamente una gran variedad de autoantígenos de tejidos periféricos). Adaptada desde la referencia [16].

El proceso de expresión promiscua en el timo es clave en el mantenimiento de la tolerancia central, ya que supone la expresión de un amplio rango de autoantígenos tejido-específicos. El destino de las células T depende de la cantidad de antígeno expresado. Si hay una expresión mínima del autoantígeno, las células T con alta afinidad por el antígeno madurarán con potencial autorreactivo, mientras que, si el autoantígeno es abundante en el timo, la mayoría de las células T serán eliminadas [17].

Específicamente, la expresión promiscua ocurre bajo el control del regulador de la transcripción AIRE (del inglés *autoimmune regulator*). La expresión de AIRE en las células epiteliales medulares tímicas maduras promueve la expresión de más de 3000 genes diferentes, incluyendo aquellos restringidos a tejidos periféricos. AIRE regula la

transcripción a través de la modificación de histonas o complejos de remodelación de la cromatina, aunque los mecanismos concretos por los que relaja la cromatina condensada todavía no son conocidos con exactitud. Por otra parte, las mutaciones en esta molécula se han relacionado con fallos en el proceso de selección negativa de células T autorreactivas y procesos autoinmunes. Concretamente, los ratones mutantes para *Aire* presentan fenotipos autoinmunes, mientras que en humanos las mutaciones en el gen se relacionan con una enfermedad autoinmune conocida como poliendocrinopatía autoinmune tipo 1. En particular, algunos autores sugieren que la expresión promiscua de antígenos se altera en algunas enfermedades neurológicas autoinmunes, por ejemplo: la miastenia gravis (MG) se asocia con cambios tímicos y ausencia de expresión de *AIRE* [18]. Por otro lado, en el timo también sucede la producción de células T reguladoras, fundamentales para el mantenimiento de la autotolerancia en la periferia. Este proceso depende de la expresión de moléculas accesorias de células T (CD28, CTLA-4, CD40L y CD11a/CD18) y su interacción con CD80/86, CD40 y CD54 de las células estromales tímicas respectivamente [19].

En la médula ósea, las células B con receptores en su superficie interaccionan con diferentes antígenos. Cuando las células B reconocen autoantígenos, se eliminan del repertorio por apoptosis (delección clonal) [20], o sufren una edición del receptor para cambiar la especificidad del receptor de células B [21].

En la periferia, tras la selección de las células T o B, la tolerancia se mantiene por los siguientes mecanismos [13]:

- **Ignorancia inmunitaria:** Las células no se activan porque se mantienen separadas de su antígeno específico, por ejemplo, a través de una barrera anatómica, como sucede en el caso de la barrera hematoencefálica del SNC.
- **Anergia clonal:** Las células T y B con potencial autoreactivo en condiciones normales no responden al antígeno. Se cree que para que tenga

lugar la activación de estas células se requiere una “doble señal”. Esto es, por un lado, un contacto antígeno-receptor y, por otro, una segunda señal: un contacto intercelular o mecanismos dependientes de factores. Si no reciben ambas señales las células estarán inactivas funcionalmente.

- **Delección:** En ausencia de coestimulación o falta de factores de crecimiento, las células autorreactivas son eliminadas por apoptosis tras la presentación de antígenos. Por ejemplo, las células T reguladoras son capaces de provocar la muerte de células presentadoras de antígenos [22].
- **Supresión inmunitaria:** Las células autorreactivas se bloquean funcionalmente cuando, por ejemplo, una célula T reguladora suprime a una T efectora con especificidad para un antígeno secretando moléculas inmunosupresoras. Estas moléculas incluyen: las interleuquinas (IL) IL-9, IL-10, IL-35, el interferón  $\gamma$ , el factor de crecimiento transformante  $\beta$ , etc [23].

Actualmente, se acepta que el desarrollo de enfermedades autoinmunes es un fenómeno raro que se debe a una combinación de factores genéticos, inmunitarios, hormonales y medioambientales. Estos factores en conjunto forman el denominado **mosaico de autoinmunidad** [24].

Respecto a las evidencias de susceptibilidad genética a enfermedades autoinmunes, conviene destacar: los polimorfismos en moléculas importantes para el sistema inmunitario (citoquinas, receptores, etc) [25] o determinados haplotipos HLA (*human leukocyte antigen*, familia de genes de que codifica para MHC en humanos). Por ejemplo, la MG se asocia con el haplotipo conocido como AH8.1 (HLA-A1-B8-DR3-DQ2) [26]. La asociación de la autoinmunidad con los haplotipos HLA es comprensible, dado que las respuestas autoinmunitarias dependen de la activación de

células T y de la capacidad para responder ante un antígeno determinado dependiendo de las MHC. Por otra parte, estos alelos también dan forma a los receptores T, ya que los péptidos propios asociados con ciertas moléculas MHC dirigen la selección positiva de timocitos específicos hacia determinados autoantígenos. Para estimar la contribución de factores genéticos al riesgo de enfermedades autoinmunes, los científicos utilizan la comparación de gemelos monocigóticos (idénticos genéticamente) con gemelos dicigóticos [27]. Así, en el caso de la MG entre un 30-40% de gemelos monocigóticos sufren conjuntamente MG, mientras que solo un 4-5% en gemelos dicigóticos. Este ejemplo ilustra la existencia de otros factores desencadenantes del fenómeno de autoinmunidad.

Dentro de los factores medioambientales que se relacionan con la autoinmunidad se encuentran: el estrés, la contaminación, las condiciones higiénicas o los cambios en la microbiota [28]. Algunos autores señalan una relación potencial muy importante entre infecciones y enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, algunos agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos y parásitos) pueden desencadenar autoinmunidad o determinar la presencia de autoanticuerpos específicos y manifestaciones clínicas específicas [29].

Los mecanismos por los que los agentes infecciosos pueden inducir la autoinmunidad son muy variados, entre ellos se encuentran los siguientes:

- **Liberación de autoantígenos del tejido dañado:** Cuando un tejido sufre una infección, experimenta procesos como: la muerte celular, la producción de radicales libres, etc [30]. Por consiguiente, se liberan antígenos crípticos o se producen cambios en las proteínas que inducen una respuesta autoinmune [31, 32].
- ***Bystander activation*:** Una vez que el tejido sufre un daño, se produce un incremento en el procesamiento y presentación de antígenos por monocitos inflamatorios. Este mecanismo activa las células T independientemente de

su especificidad de TCR. Por tanto, se induce la expansión de células T autorreactivas y la respuesta inmunitaria frente a otros autoantígenos próximos. A este fenómeno se le conoce como *epitope spreading* (diversificación de la especificidad por un epítipo dominante en varios epítipos crípticos subdominantes). Estos nuevos epítipos pueden estar en la misma proteína (*spreading* intramolecular) y/o en diferentes proteínas (*spreading* intermolecular).

- **Patrones moleculares asociados a patógenos:** El sistema inmunitario innato reconoce patrones moleculares específicos en: la pared celular de bacterias o levaduras, el ácido ribonucleico (RNA) viral, etc. Por tanto, se puede desencadenar una respuesta autoinmune al activarse el sistema adaptativo, mediante la producción de citoquinas inflamatorias o moléculas coestimuladoras [33].
- **Activación de células T por superantígenos:** Algunas proteínas producidas por microorganismos (especialmente bacterias, micoplasma o células infectadas por virus) se unen a TCR de modo inespecífico. En consecuencia, se activan células T, algunas de ellas potencialmente autorreactivas [31, 32].
- **Mimetismo molecular:** Los epítipos compartidos entre un patógeno y el huésped son capaces de desencadenar una reactividad cruzada del TCR [34]. En otras palabras, activan las células T nativas o autorreactivas específicas contra péptidos del huésped con una secuencia de aminoácidos o estructura similar a la molécula del patógeno [31].

Los criterios para incluir una enfermedad autoinmune dentro de este mecanismo son que:

- El patógeno debe estar asociado con el inicio de la enfermedad autoinmune.
- El patógeno debe provocar una respuesta inmunitaria que reaccione de forma cruzada con los antígenos del huésped.
- El epítipo compartido (autoantígeno) debe reproducir la enfermedad en un modelo animal.
- Las células T autorreactivas o autoanticuerpos deben inducir la enfermedad en un modelo animal.

El síndrome de Guillain-Barré (polirradiculopatía inflamatoria desmielinizante aguda [AIDP, del inglés *acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*]) es un ejemplo que ilustra el proceso de mimetismo molecular. Esta enfermedad en ocasiones se precede de una infección de *Campylobacter jejuni*, tras la que los pacientes desarrollan autoanticuerpos frente al gangliósido monosialílico (GM1) [35]. La bacteria contiene el gen sialiltransferasa que induce la síntesis de lipo-oligosacáridos en la membrana externa de la bacteria. Estos lipopolisacáridos son muy similares al gangliósido GM1, por lo que pueden provocar una reacción cruzada contra este glicolípido del sistema nervioso en el huésped [36]. Los estudios de inyección de lipo-oligosacáridos, derivados de *Campylobacter jejuni*, en conejos, inducen la aparición de anticuerpos anti-GM1 y debilidad en extremidades [37]. Además, la inmunización con anticuerpos monoclonales anti-GM1 y anti-GM1 de pacientes con Guillain-Barré bloquean los potenciales de acción muscular en un co-cultivo de células musculares inervadas de rata [38].

También, en algunos casos las enfermedades autoinmunes son más comunes en un sexo que en el otro. Por esta razón, además de la susceptibilidad genética o ambiental, se sospecha también de las influencias del género. Las hormonas, como: los estrógenos, la progesterona o la testosterona, son capaces de inducir la proliferación células del sistema inmunitario y modular la producción de citoquinas y anticuerpos [39].

Asimismo, los cromosomas sexuales tal vez tengan algún papel en el desarrollo de autoinmunidad, a través de mecanismos como: diferentes patrones de inactivación del cromosoma X, duplicación del cromosoma X [40].

En definitiva, la gran variabilidad de factores que predisponen o se asocian con enfermedades autoinmunes hace que resulte muy complejo establecer la contribución relativa de cada uno en la pérdida de tolerancia.

### **3. Síndromes neurológicos autoinmunes.**

Las enfermedades autoinmunes que afectan al sistema nervioso constituyen un grupo heterogéneo de síndromes neurológicos. Estas enfermedades suceden como una manifestación remota de un cáncer sistémico (denominados **síndromes neurológicos paraneoplásicos**) o una **enfermedad neurológica autoinmune no paraneoplásica**.

Los pacientes ocasionalmente presentan manifestaciones clínicas de trastornos autoinmunes sistémicos, esto refleja su predisposición a la aparición de procesos autoinmunes. El daño neuronal puede estar mediado por inmunidad celular o humoral y los pacientes pueden presentar anticuerpos específicos dirigidos frente a proteínas neuronales intracelulares, sinápticas o extracelulares. La autoinmunidad puede afectar a cualquier estructura del SNC o periférico, incluso puede estar dirigida frente a la unión neuromuscular o el músculo. A veces, el ataque se dirige a una única estructura, como las sinápsis colinérgicas en el síndrome miasténico de Lambert-Eaton. Otras veces, el ataque autoinmune afecta a tipos celulares concretos, por ejemplo, las células de

Purkinje en la degeneración cerebelosa. Incluso pueden afectar a diferentes áreas anatómicas como en las encefalomiELITIS con manifestaciones clínicas difusas. Puede verse un resumen de las principales enfermedades autoinmunes según el lugar anatómico afecto en la **Tabla II**.

**Tabla II.** *Clasificación de enfermedades autoinmunes más frecuentes del sistema nervioso según lugar anatómico afecto.*

Lugar anatómico afecto	Enfermedad autoinmune
Cerebro	Esclerosis múltiple EncefalomiELITIS Encefalitis por anticuerpos anti-NMDAR Encefalitis límbica
Tronco-Cerebelo	Degeneración cerebelosa subaguda Encefalitis de tronco Síndrome Opsoclonus-Mioclonus Síndrome de la persona rígida
Nervio óptico	Neuritis óptica
Médula espinal	Mielitis transversa Neuro-optico miELITIS
Nervios periféricos	Polirradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante aguda Polirradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante crónica Neurimiotonía Neuronopatía sensitiva subaguda Pseudo-obstrucción gastrointestinal crónica
Unión neuromuscular	Miastenia gravis Síndrome miasténico de Lambert-Eaton
Músculo	Polimiositis Dermatomiositis

### 3.1 Esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria multifocal, generalmente recurrente, que afecta a la sustancia blanca del SNC y eventualmente conduce a una neurodegeneración progresiva. Clínicamente, la esclerosis múltiple tiene una gran variabilidad de presentaciones, dependiendo de la zona del SNC afectada [41]. Los síntomas y signos más comunes son: las alteraciones sensitivas (debido a la afectación de fibras nerviosas espinotalámicas o de las columnas posteriores), la pérdida visual (por neuritis óptica), la debilidad de predominio en las piernas (por afectación de tractos

corticoespinales), la ataxia de la marcha o de los miembros (por afectación de fibras nerviosas espinocerebelosas o cerebelosas), la visión doble (por alteraciones en el control de la motilidad ocular extrínseca, por afectación de las vías centrales que unen los núcleos de los nervios craneales) [42].

Los síndromes clínicos aislados se dan sobre todo en adultos jóvenes con síntomas neurológicos focales o multifocales. Los síntomas se desarrollan en horas o días hasta que se disipan gradualmente, dejando o no un déficit residual. En dos años, el 50% de los pacientes presentan recaídas (esclerosis múltiple remitente-recurrente).

Aproximadamente, el 65% de estos pacientes desarrollan una enfermedad neurodegenerativa progresiva crónica del SNC secundaria (esclerosis múltiple secundaria progresiva). El curso clínico implica varias décadas en todos los casos, con una media de tiempo hasta la muerte de unos 30 años tras el debut [41].

Existen diferentes evidencias que apoyan el origen autoinmune de la esclerosis múltiple. En 1933, Thomas Rivers demostró que la inyección repetida de extractos de cerebro y médula espinal de conejo en primates producía una enfermedad desmielinizante en mamíferos, denominada encefalomiелitis autoinmune experimental [43]. Algunos pacientes tienen autoanticuerpos en el suero y líquido cefalorraquídeo frente a antígenos de la mielina, como: la proteína básica de la mielina, la proteína proteolípídica y la glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (MOG, del inglés *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) [44, 45]. Algunos de estos anticuerpos, tal vez tengan un papel patogénico en la enfermedad. Así, los anticuerpos anti-MOG poseen efectos biológicos patogénicos *in vitro*, son capaces de activar el complemento y las células *natural killer* y producen toxicidad que altera el citoesqueleto de oligodendrocitos [46]. Los pacientes con anticuerpos anti-MOG positivos tienen la citoquina IL-6 elevada en el líquido cefalorraquídeo, esta citoquina es capaz de activar células B [47]. Sin embargo,

en la patogénesis de la esclerosis múltiple se sospecha de la existencia de varios mecanismos implicados. Por ejemplo, infiltrados de células T y macrófagos que producen daño tisular, reacciones de autoanticuerpos mediados por complemento frente a la mielina u oligodendrocitos, daño por hipoxia y susceptibilidad genética o polimorfismos que conducen a un daño inmunitario de los oligodendrocitos [41].

### **3.2 Neuropatías periféricas agudas y crónicas.**

El síndrome de Guillain-Barré se caracteriza por una parálisis neuromuscular flácida aguda. Incluye las variantes: polirradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante aguda (AIDP), neuropatía aguda motora axonal (AMAN, del inglés *acute motor axonal neuropathy*), neuropatía aguda axonal motora y sensitiva (AMSAN, del inglés *acute motor sensory neuropathy*) y síndrome de Fisher (ataxia, oftalmoplejía y arreflexia).

Los estudios electrofisiológicos permiten diagnosticar los diferentes subtipos del síndrome de Guillain-Barré. El subtipo más frecuente es la AIDP, en el 95% de los casos con síndrome Guillain-Barré [48].

Aproximadamente el 60% de pacientes con síndrome de Guillain-Barré presentan anticuerpos anti-gangliósidos policlonales, capaces de fijar el complemento y formar el complejo de ataque de la membrana [49-51]. Los anticuerpos frente a mono, di o tetrasialogangliósidos (GM1, GD1a, b y GQ1b respectivamente) producen el bloqueo de las terminales pre- y postsinápticas [52]. Además, diversos estudios con modelos animales demuestran que los anticuerpos anti-gangliósidos pueden: unirse al nervio, fijar complemento y destruir la arquitectura nodal o del citoesqueleto. También, existen correlaciones clínico-serológicas entre los subtipos de Guillain-Barré y los anticuerpos frente gangliósidos específicos [53-55]. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GM1 y GD1a se asocian con AMAN, mientras que los anticuerpos anti-GQ1b están presentes en el 90% de los pacientes con síndrome de Fisher. Algunos autores sugieren que estos

anticuerpos bloquean o alteran la función de canales por un mecanismo desconocido y que la variación en la inmunolocalización de los gangliósidos explica la diferencia entre variantes del síndrome de Guillain-Barré, así por ejemplo, GM1 y GD1a se localizan en los nodos de Ranvier y terminales motoras [56].

En cuanto a las neuropatías crónicas, la polirradiculopatía crónica inflamatoria demielinizante (CIDP, del inglés *chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*) es una enfermedad adquirida del sistema nervioso periférico progresiva o remitente que se caracteriza por debilidad distal y proximal con o sin pérdida sensitiva. Se distinguen las siguientes variantes: la neuropatía multifocal motora con bloqueos de conducción (entre un 30-80% tienen anti-GM1) [57], la neuropatía multifocal sensitiva y motora [58], y la neuropatía desmielinizante paraproteínica. Esta última, normalmente se trata de una gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS, del inglés *monoclonal gammopathy of undetermined significance*). En estos casos, más del 50% de los pacientes tienen inmunoglobulina M (IgM) frente a la glicoproteína asociada a mielina (MAG, del inglés *myelin-associated glycoprotein*) [59].

El origen autoinmune de la CIDP se sospecha debido a: la rápida respuesta al tratamiento de plasmaferesis, la existencia de depósitos de complemento en las láminas de mielina de las biopsias de los pacientes y el bloqueo de la conducción en modelos de transferencia pasiva de inmunoglobulinas de tipo G (IgGs) de pacientes con CIDP [60, 61].

Debido a la naturaleza desmielinizante de estas enfermedades, los estudios iniciales se centraron en los antígenos de mielina y se describieron asociaciones con anticuerpos anti-glicopéptidos P0, P2, además de los gangliósidos GM1 y GD1b [62-64]. La transferencia pasiva de anticuerpos anti-P0 produce un bloqueo de la conducción

nerviosa y desmielinización [62]. Sin embargo, los estudios posteriores no confirmaron la utilidad clínica de los anticuerpos anti-P0 [65].

Los estudios de microscopía electrónica señalaron una alteración en regiones nodales y paranodales en las células de Schwann de los nervios de pacientes con CIDP. Por esta razón, la búsqueda de antígenos se derivó al estudio de proteínas de estas regiones [61].

Actualmente, se han descrito anticuerpos dirigidos frente a diferentes proteínas de la región nodal y paranodal, entre ellas: la gliomedina, la neurofascina-155 y 186, la contactina-1, etc [66-68]. A pesar de que los anticuerpos anti-contactina-1 solo representan a un 6% de los pacientes con CIDP descritos inicialmente, definen un subgrupo de pacientes con características fenotípicas de: edad avanzada, CIDP predominantemente motora, daño axonal en el debut, mejor respuesta al tratamiento con esteroides y respuesta pobre a Igs intravenosas [68]. Estudios independientes con grandes series de pacientes confirman la proporción de pacientes con anticuerpos IgG<sub>4</sub> anti-contactina-1 en 13 de 533 (2.4%) y las características clínicas de pobre respuesta a Igs intravenosas y mejor respuesta a corticoesteroides. Es decir, los anticuerpos anti-contactina-1 parecen tener utilidad como biomarcadores de la opción terapéutica [69].

Otro grupo describió la alteración en la estructura paranodal en biopsias de nervio sural y piel en pacientes con CIDP y anticuerpos IgG<sub>4</sub> anti-contactina-1. Además, propusieron por primera vez el término “paranodopatía”, ya que este subgrupo de pacientes no cumplía los criterios morfológicos típicos de una neuropatía periférica desmielinizante [70]. Por otro lado, los anticuerpos anti-neurofascina-155 son también de clase IgG<sub>4</sub> y describen a un subgrupo de pacientes con CIDP con las siguientes características fenotípicas: debilidad predominantemente distal, asociación con una neuropatía motora-sensitiva, ataxia, pobre respuesta al tratamiento con Igs intravenosas [60, 67]. Los anticuerpos anti-contactina-1 y anti-neurofascina-155, tienen un valor diagnóstico y pronóstico, y además son capaces de definir subtipos de pacientes con

CIDP [68]. La alteración de estas proteínas podría producir cambios en la estructura nodal y en la conducción nerviosa, ya que son accesibles para los anticuerpos [61, 66]. Respecto a la patogenia de estos anticuerpos, actualmente se sabe que la inyección intraneural de anticuerpos anti-pan-neurofascina produce un bloqueo de la conducción reversible. Y los anticuerpos anti-contactina-1 interaccionan con residuos glicosilados de la contactina-1, evitan la unión del complejo contactina-1/Caspr1 con la neurofascina-155 glial y alteran la estructura nodal de un modo independiente de complemento o células inflamatorias [71]. Además, la transferencia de anticuerpos IgG<sub>4</sub> anti-contactina-1 en ratas produce: ataxia, defectos de conducción motora y desmielinización, demostrando que estos anticuerpos que son patogénicos [72].

En conclusión, pese al pequeño número de pacientes con CIDP seropositivos (no más de un 13% de los casos), el estudio de proteínas de la región nodal o paranodal abre un campo de investigación en el estudio de futuras dianas antigénicas en estas enfermedades. Sin embargo, son necesarios más estudios para valorar el papel primario de los anticuerpos en la patofisiología de la enfermedad.

### **3.3 Miastenia gravis y trastornos asociados.**

La MG es una enfermedad neurológica rara en la que los pacientes presentan una debilidad muscular fluctuante, que afecta preferentemente a algunos grupos musculares. El 85% de los pacientes con MG generalizada tienen anticuerpos contra los receptores de acetilcolina (AChR, del inglés *Acetylcholine receptor*), medidos por inmunoprecipitación con  $\alpha$ -bungarotoxina-I<sup>125</sup> (toxina de la serpiente *Bungarus multicinctus* que se une específicamente a los AChR) [73]. También, pueden presentar anticuerpos frente a otros componentes esenciales para la organización de la unión neuromuscular: el receptor tirosinquinasa específico del músculo (MuSK) [74] o la lipoproteína de baja densidad relacionada con el receptor 4 [75]. No existe una única

entidad clínica y se diferencian de acuerdo con: la edad de debut, la patología del timo y las asociaciones HLA [76]. En la forma neonatal, la transferencia materno-fetal de anticuerpos anti-AChR o MuSK, produce una debilidad transitoria en los recién nacidos que requiere el tratamiento durante unas semanas [77, 78].

El síndrome miasténico de Lambert-Eaton es un trastorno similar a la MG, pero se diferencia clínica y electrofisiológicamente de ésta. El 50% de los casos de síndrome miasténico de Lambert-Eaton se asocian con cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, del inglés *small-cell lung cancer*). El 90% de los pacientes tienen anticuerpos anti-canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs, del inglés *voltage-gated calcium channels*) de tipo P/Q que se detectan por radioinmunoensayo de un extracto de cerebro de mamífero marcado con  $\omega$ -conotoxina (toxina de la serpiente *Conus magnus* que se une específicamente a los canales VGCC). Otros anticuerpos asociados con el síndrome de Lambert-Eaton son: la sinaptotagmina [79] y SOX1 (del inglés *sex determining region Y-box 1*) en 65% de los pacientes paraneoplásicos [80]. Al igual que en la MG, también existe transferencia materno-fetal de la enfermedad [81].

#### **4. Encefalitis autoinmunes. Síndromes neurológicos paraneoplásicos.**

Los síndromes neurológicos de origen autoinmune se clasifican en: síndromes neurológicos paraneoplásicos o no paraneoplásicos. Los síndromes paraneoplásicos son un grupo heterogéneo de alteraciones en presencia de un tumor con síntomas que no se originan por: el crecimiento del tumor, la expansión metastásica, las infecciones o los efectos tóxicos y metabólicos asociados con el tumor subyacente [82]. Los síndromes neurológicos paraneoplásicos afectan a cualquier parte del sistema nervioso y comparten su asociación con un cáncer (frecuentemente oculto). En algunos casos, se acepta una etiopatogenia posiblemente autoinmune desencadenada por la expresión

sistémica de proteínas neuronales en el tumor [83, 84]. Los síndromes neurológicos paraneoplásicos son muy heterogéneos en cuanto a la presentación clínica, evolución y pronóstico, respuesta al tratamiento, tipo de tumor y marcadores inmunitarios asociados. Las manifestaciones clínicas dependen fundamentalmente de que componente del sistema nervioso se ve afectado [85]. A pesar de que los síndromes neurológicos paraneoplásicos son enfermedades poco frecuentes (se estima que afectan entre un 0.01%-1% de pacientes con cáncer), saber diagnosticarlas es trascendental en la práctica clínica. En la mayoría de los casos, los síntomas neurológicos preceden al descubrimiento del tumor y la detección de un síndrome paraneoplásico es muy importante para la rápida detección del tumor subyacente. Además, el tratamiento del tumor, en ocasiones, es la medida más eficaz para mejorar el síndrome neurológico [86, 87].

Algunas pistas clínicas que indican la presencia de un síndrome neurológico paraneoplásico son: la presentación subaguda, la afección simultánea o consecutiva de diferentes áreas del SNC o periférico y si hay factores de riesgo tumoral en el individuo (pérdida de peso, hábito fumador, etc). El primer paso es descartar otras posibles causas, como: la carcinomatosis, las metástasis, las causas tóxicas o metabólicas [88]. Si la sospecha clínica del origen paraneoplásico persiste, lo siguiente es evaluar la presencia de anticuerpos asociados con estos síndromes. Los anticuerpos antineuronales asociados con los síndromes neurológicos paraneoplásicos se dividen en dos categorías:

- **Anticuerpos dirigidos contra antígenos neuronales intracelulares:**  
Denominados **onconeuronales** porque su detección casi siempre indica un síndrome paraneoplásico.
- **Anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie neuronal o sináptica:** Asociados o no con un síndrome paraneoplásico [84, 89].

Una de las principales características de los síndromes neurológicos paraneoplásicos es que los síntomas son frecuentemente irreversibles y los anticuerpos se dirigen frecuentemente frente a proteínas intracelulares.

Para que un anticuerpo onconeuronal esté bien caracterizado se debe cumplir que:

- El anticuerpo onconeuronal tenga un patrón reconocible de inmunohistoquímica y especificidad confirmada por inmunoblot con proteínas recombinantes.
- Exista un alto número de casos descritos asociados con tumores.
- Los síndromes neurológicos asociados estén bien caracterizados.
- Los anticuerpos onconeuronales estén identificados en diferentes estudios por distintos grupos de investigación y tengan una baja frecuencia en pacientes sin cáncer [85].

Cuando los anticuerpos se dirigen contra moléculas de superficie, los pacientes normalmente se recuperan por completo o mejoran con inmunoterapia o el tratamiento del tumor. Hasta hace pocos años, solamente se conocía la MG y el síndrome miasténico de Lambert-Eaton como enfermedades autoinmunes causadas por anticuerpos dirigidos frente a canales iónicos o receptores de superficie. En la última década, se han descrito numerosos autoanticuerpos dirigidos contra canales iónicos o receptores asociados con diferentes enfermedades del SNC, en contexto paraneoplásico o no. La mayoría de autoanticuerpos dirigidos contra proteínas de superficie neuronal o sináptica (descritos hasta el momento) se manifiestan como encefalitis autoinmunes [89]. Puede verse una lista de los anticuerpos onconeuronales o dirigidos contra proteínas de superficie relacionados con síndromes neurológicos paraneoplásicos en la **Tabla I2**.

**Tabla I2.** Anticuerpos contra antígenos neuronales intracelulares o de superficie y su asociación con síndromes neurológicos paraneoplásicos. Adaptada de [84, 89].

Anticuerpos contra antígenos intracelulares <sup>a</sup>	Antígeno	Síndromes neurológicos más frecuentes	Tumores asociados más comunes
Anti-CV2 (CRMP5)	CRMP5	Encefalomielitis con afectación motora, uveítis y corea	SCLC, timoma
Anti-Hu	HuD	Encefalomielitis	SCLC
Anti-proteínas Ma	Ma	Encefalitis límbica de tronco cerebral, hipotalámica	Ma2: hombres <45 años, testículo
Anti-recoverina	Recoverina	Retinopatía	SCLC
Anti-Ri	NOVA-1	Encefalitis de tronco, opsoclonus	Pecho, ginecológico
Anti-Tr	DNER	Degeneración cerebelosa	Linfoma de Hodking, no Hodking
Anti-Yo	CDR2, CDR62	Degeneración cerebelosa	Ovario, pecho
Anticuerpos de superficie <sup>b</sup>	Antígeno	Síndromes neurológicos más comunes	Tumores asociados más frecuentes
Anti-AChR	AChR	Miastenia gravis	Timoma
Anti-AMPA	AMPA	Encefalitis límbica	SCLC, timoma, pecho
Anti-anfifisina	Anfifisina	Síndrome de la persona rígida, encefalomielitis, degeneración cerebelosa	Pecho, SCLC
Anti-Caspr2	Caspr2	Neuromiotonía, síndrome de Morvan	Timoma
Anti-DPPX	DPPX	Encefalitis	Linfoma (<10%)
Anti-GABA(a)R	GABA(a)R	Encefalitis	Timoma
Anti-GABA(b)R	GABA(b)R	Encefalitis límbica	SCLC
Anti-GAD	GAD65	Encefalitis límbica, ataxia cerebelosa, síndrome de la persona rígida	Tumores neuroendocrinos
Anti-GluR1	mGluR1	Degeneración cerebelosa	Linfoma de Hodking
Anti-GluR5	mGluR5	Encefalitis límbica	Linfoma de Hodking
Anti-GlyR	GlyR	Encefalomielitis progresiva con mioclonus	Timoma, linfoma (<5%)
Anti-LGI1	LGI1	Encefalitis límbica	Timoma
Anti-NMDAR	NMDAR	Encefalitis	Mujeres >12 años y <45 años: Teratoma de ovario Hombres/Mujeres > 45 años: Tumores sólidos
Anti-VGCC	VGCC	Síndrome miasténico de Lambert-Eaton	SCLC

Abreviaturas utilizadas: AChR, *acetylcholine receptor*; AMPAR, *α-amino-3-hydroxy-5-methylisocazole-4-propionic acid receptor*; Caspr2, *contactin-associated protein-like 2*; CDR, *cerebellar degeneration-related protein*; CRMP5, *collapsin-receptor mediated protein 5*; GABA(b)R, *gamma-amino-butyric acid type B receptor*; DNER, *delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor*; DPPX, *dipeptidyl-peptidase-like protein-6*; GAD, *glutamic acid decarboxylase*; mGluR1, *metabotropic glutamate receptor 1*; GlyR, *glycine receptor*; HuD, *Hu antigen D*; LGI1 *leucine-rich glioma inactivated 1*; mGluR5, *metabotropic glutamate receptor 5*; Ma; proteína 1,2 específica testicular y neuronal; NOVA1, *RNA-binding protein Nova-1*; NMDAR, *N-methyl-D-aspartate receptor*; SCLC, *small-cell lung cancer*; VGCC, *voltage-gated calcium channel*.

<sup>a</sup> Únicamente se indican anticuerpos onconeuronales bien caracterizados descritos por varios grupos de investigación diferentes, ya que anticuerpos descritos en pocos casos o por solo un grupo de investigación requieren más estudios para la confirmación de la asociación con un síndrome neurológico paraneoplásico específico.

<sup>b</sup> Los anticuerpos de superficie pueden aparecer en un contexto paraneoplásico o no. Solamente se indican aquellos que han sido descritos asociados con cáncer.

Para evitar falsos negativos es recomendable evaluar la presencia de los anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo, ya que los títulos de anticuerpos son mayores que en el suero [84]. Además, en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes se pueden observar los siguientes cambios: pleiocitosis linfocítica, presencia de bandas oligoclonales, y, en algunos casos, elevada proteína. Concretamente, en más del 93% de los casos de pacientes con síndrome neurológico paraneoplásico, al menos uno de estos tres parámetros es anormal [90]. Otros estudios diagnósticos complementarios que pueden ayudar en el diagnóstico son: la imagen por resonancia magnética y/o tomografía por emisión de positrones del cerebro y el electroneurodiagnóstico. Así por ejemplo, en el caso de la imagen por resonancia magnética, en pacientes con encefalitis límbica se observa un aumento de la señal T2 en uno o dos lóbulos temporales [91]. Por otro lado, en pacientes con encefalitis límbica, el electroencefalograma muestra anormalidades en la región temporal y el electromiograma es especialmente útil en pacientes con alteraciones de la unión neuromuscular [92].

De acuerdo con la *Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork* los criterios diagnósticos que definen un síndrome neurológico paraneoplásico son:

- Presencia de un síndrome neurológico paraneoplásico clásico (véase la **Tabla I3**) y un cáncer que se desarrolla entre los cinco años del diagnóstico del trastorno neurológico.
- Presencia de un síndrome neurológico paraneoplásico no clásico (véase la **Tabla I3**) que se resuelve o mejora tras el tratamiento del cáncer.
- Presencia de un síndrome neurológico no clásico, anticuerpos onconeuronales y cáncer entre los cinco años del diagnóstico del trastorno neurológico.
- Presencia de un síndrome neurológico (clásico o no) con anticuerpos onconeuronales bien caracterizados sin cáncer.

**Tabla I3.** *Síndromes neurológicos paraneoplásicos.* Adaptada de [93].

Síndromes paraneoplásicos clásicos	Síndromes paraneoplásicos no clásicos
<b>Cerebro</b> Encefalitis límbica Encefalomielitis	Encefalopatía desmielinizante Corea
<b>Tronco cerebral y cerebelo</b> Degeneración cerebelosa subaguda Síndrome opsoclonus-mioclonus	Encefalitis de tronco
<b>Médula espinal</b> Neuronopatía motora subaguda	Enfermedad de la motoneurona Neuro-óptico mielitis Mielitis transversa Síndrome de la persona rígida
<b>Nervios periféricos y ganglios de las raíces dorsales</b> Neuronopatía sensitiva aguda Pseudo-obstrucción gastrointestinal crónica	Polirradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante aguda Polirradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante crónica Neuromiotonía
<b>Unión neuromuscular y músculo</b> Dermatomiositis Síndrome miasténico de Lambert-Eaton	Miastenia gravis Miopatía necrotizante Miositis con cuerpos de inclusión Polimiositis

De acuerdo con un estudio prospectivo observacional del consorcio *Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork* realizado entre 2000 y 2008, el 78% (de los 979 pacientes estudiados) desarrollaron un síndrome neurológico paraneoplásico clásico. De ellos, el síndrome del SNC más frecuente fue la degeneración cerebelosa subaguda (24.3%), seguida de la encefalitis límbica (10%), mientras que en el sistema nervioso periférico lo más frecuente fue la neuropatía sensorial (23.4%) [94].

## 5. Patogenia de las enfermedades con anticuerpos frente a antígenos intracelulares.

Los anticuerpos dirigidos contra proteínas intracelulares incluyen:

- **Antígenos neuronales citoplásmicos:** Hu, Yo, CV2/CRMP5, recoverina, Ri, Ma1/2, Tr/DNER.
- **Antígenos intracelulares sinápticos:** Descarboxilasa de ácido glutámico de 65KDa (GAD65) y anfifisina.

Pese a que el mecanismo patogénico de las enfermedades con anticuerpos contra proteínas intracelulares todavía no se comprende con exactitud, de acuerdo con la hipótesis autoinmune el paciente produce anticuerpos para limitar el crecimiento de un tumor y al mismo tiempo generara anticuerpos que reaccionan contra antígenos neuronales expresados en el tumor ectópicamente (**antígenos onconeuronales**). Estos antígenos, normalmente, tienen una expresión restringida al sistema nervioso u otras zonas inmunoprivilegiadas. Por consiguiente, la expresión en el tumor activa células T y B autorreactivas específicas contra el antígeno onconeuronal y el antígeno del sistema nervioso [95, 96]. Esta hipótesis se ve reforzada por la presencia de autoanticuerpos y la expresión de los mismos antígenos en el tejido tumoral de los pacientes. Además, el antígeno presente en el tumor es idéntico al encontrado en el sistema nervioso [97].

Cuando el antígeno es intracelular, a diferencia de los antígenos de superficie, es posible que los autoanticuerpos no tengan un papel patogénico directo (ya que el acceso a su diana está más restringido) y actuen como unos simples indicadores de la activación de un proceso inflamatorio. Generalmente, se acepta que es un proceso irreversible **mediado por células T citotóxicas** CD8<sup>+</sup> que conduce a la formación de canales por la inserción de perforina. Por ende, sucede una disfunción en la señalización eléctrica entre las neuronas, ya sea por: el aumento de calcio intracelular, que altera la excitabilidad neuronal (independiente del antígeno), o a la muerte celular progresiva por apoptosis (dependiente de antígeno) [98]. Estos procesos son irreversibles y se asocian con la peor respuesta a inmunoterapia que presentan estos pacientes [99].

Un ejemplo que ilustra el papel patogénico de estos anticuerpos es el antígeno HuD. HuD es una proteína asociada con el RNA mensajero que se expresa en el núcleo y el citoplasma de neuronas del SNC y periférico [100]. Los anticuerpos anti-HuD, presentes tanto en el suero [101] como en el líquido cefalorraquídeo [102] de los

pacientes, son capaces de fijar complemento. La exposición de los anticuerpos anti-Hu a cultivos de células de neuroblastoma o cultivos organotípicos de cerebelo e hipocampo produce muerte celular [103, 104]. Sin embargo, en los estudios de transferencia pasiva de anticuerpos anti-Hu, con diferentes animales de experimentación (rata, ratón y cobaya), no se desarrollan los síntomas de la enfermedad neurológica [105]. El antígeno HuD se expresa en el tumor de los pacientes y un 20% de los pacientes con SCLC tienen anticuerpos anti-Hu. No obstante, menos de un 0.01% de los pacientes desarrollan síndromes neurológicos paraneoplásicos [86]. Conviene destacar que en las autopsias de los pacientes con encefalomiелitis/neuronopatía sensorial y anticuerpos anti-Hu existen infiltrados de células T próximos a neuronas sensoriales con moléculas MHC de clase I en su superficie [102, 106]. Todas estas evidencias apuntan a que estos anticuerpos no son directamente patogénicos, sino más bien indican un proceso mediado por células T.

Otro ejemplo de la patofisiología de los anticuerpos dirigidos contra moléculas intracelulares es el antígeno Yo. Yo es una proteína de 62KDa que se expresa en el citoplasma de las células de Purkinje del cerebelo [107]. Los pacientes con degeneración cerebelosa presentan anticuerpos anti-Yo policlonales capaces de fijar el complemento [108]. Y los tumores ginecológicos de los pacientes expresan el antígeno reconocido por los anticuerpos anti-Yo [109]. Los anticuerpos anti-Yo se dirigen específicamente contra las células de Purkinje del cerebelo, y reaccionan contra la membrana de los ribosomas y el retículo endoplásmico rugoso de estas células [110]. La exposición de los anticuerpos anti-Yo a cultivos organotípicos de cerebelo produce la muerte celular no apoptótica de las células de Purkinje [111]. Sin embargo, los estudios de transferencia pasiva de anticuerpos anti-Yo, inmunización directa, inyección intraventricular o intraperitoneal con disrupción de la barrera hematoencefálica, no demuestran la patogenicidad directa de los anticuerpos en animales [112-114]. En las

autopsias del cerebelo de los pacientes con anticuerpos anti-Yo hay una pérdida de células de Purkinje, sin depósitos de anticuerpos o complemento, con células T citotóxicas y activación de la microglia [115].

A diferencia de los anticuerpos frente a proteínas intracelulares, los anticuerpos dirigidos frente antígenos sinápticos (GAD65 y anfifisina) son accesibles para los anticuerpos durante la fusión y recaptación de vesículas sinápticas. GAD65 se asocia a la membrana interna de vesículas de neuronas GABAérgicas o de microvesículas de las células  $\beta$ -pancreáticas [116], mientras que la anfifisina es una molécula necesaria en la endocitosis de vesículas sinápticas de clatrina [117]. Los anticuerpos dirigidos contra moléculas sinápticas podrían actuar a través de: la internalización en las terminales presinápticas de neuronas inhibitorias, la interrupción de la transmisión sináptica inhibitoria y el reciclaje de vesículas inhibitorias [118]. En los casos de anticuerpos dirigidos frente antígenos sinápticos, existen evidencias de una combinación de mecanismos patogénicos mediados por anticuerpos y por células T. La inyección de anticuerpos anti-GAD65 en animales de experimentación reproduce las características clínicas de los pacientes [119]. GAD65 se expresa en los tumores neuroendocrinos (pancreático y carcinoma tímico) de los pacientes, donde además existen infiltrados de células B que podrían desencadenar el proceso autoinmune [120-122]. La transferencia pasiva de anticuerpos anti-anfifisina produce rigidez y espasmos musculares en los animales [118, 123], y en otros experimentos incluso ansiedad y unión de los anticuerpos con estructuras límbicas (hipocampo, amígdala) [124]. Los estudios post-mortem de un paciente con anticuerpos anti-anfifisina indican la presencia de infiltrados de células T citotóxicas en el cerebro, médula espinal y ganglios de las raíces dorsales [125].

## 6. Patogenia de las enfermedades con anticuerpos frente a antígenos de superficie.

En las enfermedades autoinmunes neurológicas los anticuerpos contra antígenos de superficie se unen a moléculas sinápticas, extrasinápticas y canales iónicos dependientes de voltaje. Estas moléculas se relacionan con la transmisión sináptica excitatoria: los receptores *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic receptor* (AMPA), *N-methyl D-aspartate receptor* (NMDAR), *metabotropic glutamate receptor 1, 5* (mGluR1, mGluR5), AChR, o los canales VGCCs; con la transmisión sináptica inhibitoria: los receptores *γ-aminobutiric acid receptor type B* (GABA<sub>B</sub>), *glycine receptor* (GlyR), la proteína *leucine-rich glioma inactivated protein 1* (LGI1); o con la región juxtapanodal de los nodos de Ranvier: la proteína *contactin-associated protein-like 2* (Caspr2).

La reproducción de los síntomas de las enfermedades neurológicas, con experimentos de transferencia pasiva de autoanticuerpos humanos a animales de experimentación, se ha demostrado claramente en algunas enfermedades autoinmunes que afectan al sistema nervioso periférico cuyos anticuerpos están dirigidos contra proteínas de superficie: MG, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton. Sin embargo, en el caso del SNC hay un número pequeño de casos descritos o no hay una evidencia de patogenicidad tan clara con los estudios *in vitro* o *in vivo*, salvo en algunos casos más estudiados, como las encefalitis autoinmunes con anticuerpos anti-NMDAR.

### 6.1 Miastenia gravis.

La primera asociación de síntomas neurológicos y autoinmunidad mediada por anticuerpos se observó en pacientes con MG adquirida [126]. En 1973 Patrick y Lindstrom inmunizaron conejos repetidamente con AChR purificado del órgano eléctrico de *Electrophorus electricus* y provocaron experimentalmente algunas

características de la MG: debilidad muscular, disminución de la respuesta a la estimulación nerviosa repetida en electromiograma que se revierte con inhibidores de acetilcolinesterasa [127]. Dos años después, se repitieron los resultados en otros mamíferos: rata, conejillo de indias [128], monos [129], ratón [130]. Esto supuso la primera demostración de que un factor circulante en el suero de los pacientes con MG, al ser transferido a animales de experimentación, reproducía las características clínicas enfermedad. En los pacientes con MG existían también evidencias de ataques inmunitarios contra la membrana postsináptica: depósitos de Igs y de complemento en las uniones musculares [131, 132]. Lindstrom *et al* demostraron que el 85% de los pacientes tenían elevados niveles de anticuerpos específicos contra el AChRs, utilizando  $\alpha$ -bungarotoxina- $I^{125}$  para marcar radioactivamente los AChR humanos [73]. En 1980 se confirmó la inducción de MG simplemente con la transferencia de anticuerpos monoclonales anti-AChRs en animales [133]. Los anticuerpos de los pacientes son policlonales con diferentes isotipos, mayoritariamente IgGs de tipo IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> (capaces de activar el complemento), y reaccionan contra diferentes epítomos de la superficie de AChRs [134], especialmente contra dominio extracelular N-terminal de la cadena  $\alpha$  del AChR que contiene el sitio de unión del ligando y la región principal inmunogénica (secuencia  $\alpha$ 64-76) [135]. La inmunización por si sola con estos dominios extracelulares correctamente plegados es suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria en los modelos animales experimentales de MG [136]. Los mecanismos de acción por los que los anticuerpos IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub> contra el AChR reducen el número de AChRs funcionales en el músculo son variados, incluyen: la activación del complemento, formación del complejo de ataque de la membrana y lisis de la membrana postsináptica [131, 132], el entrecruzamiento de subunidades  $\alpha$ 1 de AChRs adyacentes y aceleración de la tasa de degradación de los AChRs por endocitosis [137], el bloqueo de la unión de la acetilcolina con el receptor [138], o la inhibición de la apertura del canal iónico de

forma reversible [139, 140]. Los pacientes con MG también presentan células T específicas contra el AChR purificado [141], o contra diferentes péptidos sintéticos AChR, pero también se encuentran en controles sanos, siendo muy difícil establecer su relación con la patogenicidad [142, 143].

## **6.2 Encefalitis autoinmunes con anticuerpos anti-NMDAR.**

La encefalitis mediada por anticuerpos anti-NMDAR es la encefalopatía mediada por anticuerpos más común, ya que supone aproximadamente un 4% de encefalitis diagnosticadas [144]. A diferencia de los casos con anticuerpos dirigidos contra antígenos neuronales intracelulares, en los pacientes con encefalitis anti-NMDAR la respuesta al tratamiento de inmunoterapia es mejor y la asociación tumoral es menos consistente [145]. Los receptores de NMDA son heterotetrámeros con dos subunidades: NR1/GluN1 y NR2/GluN2 o NR3/GluN3. La región inmunogénica principal está en la subunidad NR1/GluN1 (región N368/G639) [146, 147].

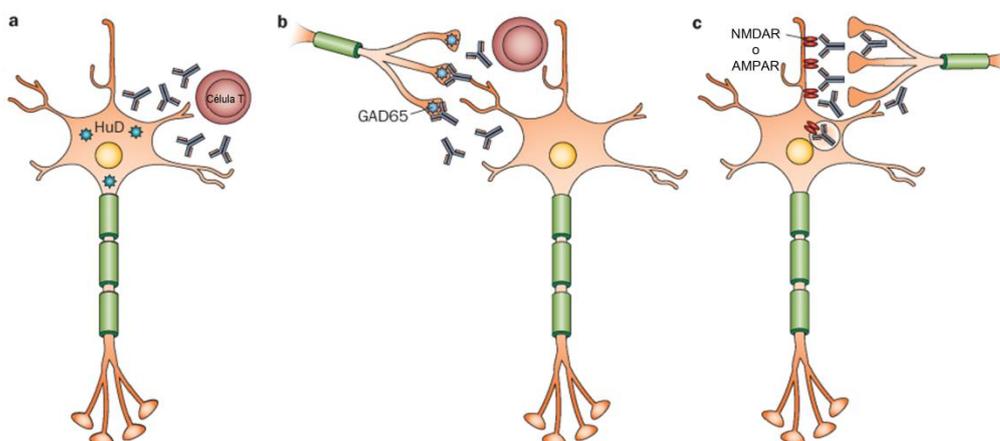
Las evidencias de la patogenicidad de los anticuerpos anti-NMDAR incluyen observaciones clínicas, experimentos *in vitro* y más recientemente *in vivo*.

Independientemente de la severidad y duración de la enfermedad, la mayoría de los pacientes responden a la inmunoterapia y a la eliminación del tumor (si esta presente).

La inmunoterapia dirigida contra las células productoras de anticuerpos células B CD20<sup>+</sup> (Rituximab) mejora la recuperación [148]. Los títulos de los anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo se correlacionan con el curso de la enfermedad, caen en pacientes tratados y se mantienen elevados en pacientes con peores resultados clínicos o teratoma [149]. Además, los primeros síntomas de la encefalitis anti-NMDAR (déficit cognitivo, pérdida de memoria anterógrada y alteraciones psiquiátricas) son muy similares a los síntomas que produce la alteración farmacológica con antagonistas de los receptores en animales y humanos sanos [150, 151]. El fenotipo de los mutantes para el

gen que codifica para la subunidad NR1/GluN1 de NMDAR (convulsiones de aparición temprana y alteraciones del movimiento con características dismórficas) también se asemeja a la encefalitis anti-NMDAR [152]. La exposición de los anticuerpos anti-NMDAR de los pacientes con neuronas en cultivo disminuyen reversiblemente la densidad NMDAR en la superficie de las dendritas de las neuronas y las corrientes excitatorias NMDAR. Sin embargo, no modifican la localización o expresión de otras proteínas sinápticas, el número de sinapsis, la complejidad dendrítica o la supervivencia celular. Además, la exposición de los anticuerpos anti-NMDAR de los pacientes con células de riñón embrionarias humanas (HEK293T, del inglés *human embryonic kidney cells 293 T*) que expresan NMDAR prolonga la duración de la apertura del NMDAR [147]. Por tanto, la disminución del número de NMDAR y la modificación de las propiedades del canal son dos posibles mecanismos patogénicos de estos anticuerpos. Las autopsias de los pacientes comparadas con pacientes con encefalitis no anti-NMDAR también muestran una menor intensidad de tinción NMDAR en el hipocampo. Aunque los anticuerpos anti-NMDAR son de los subtipos IgG<sub>1</sub>, hasta el momento, no se han descrito depósitos de complemento en el cerebro de pacientes con encefalitis y anti-NMDAR [153], solamente se han observado depósitos de IgG, células B y células plasmáticas en espacios perivasculares en el cerebro [146, 153, 154]. La transferencia pasiva intracerebroventricular de anticuerpos anti-NMDAR de humano a ratón produce: déficits de memoria (fallos en el reconocimiento de objetos nuevos), anhedonia (disminución del consumo de sacarosa en el test de preferencia de sacarosa) y alteraciones del comportamiento (déficits en el test de la cola en suspensión y de natación forzada). Además, coincide con la disminución de grupos de NMDAR en el hipocampo de los animales y se resuelve en una semana tras cesar la infusión de anticuerpos [155].

En definitiva, la evidencia experimental sugiere que los anticuerpos anti-NMDAR son directamente patogénicos (sin participación de células T o citotoxicidad mediada por complemento) y actúan reduciendo la densidad de grupos de NMDAR por la internalización de los receptores, de un modo similar a lo que sucedía con los AChRs en la MG [153]. Las diferencias entre los mecanismos patogénicos de los anticuerpos dirigidos contra moléculas neuronales de superficie, sinápticas o intracelulares puede verse en la **Figura I2**.



**Figura I2.- Mecanismos patogénicos dirigidos contra autoantígenos neuronales.** (A) Los estudios de transferencia pasiva muestran que los anticuerpos dirigidos contra moléculas intracelulares no son directamente patogénicos pero podrían ser indicativos de una respuesta mediada por células T citotóxicas. (B) Los antígenos sinápticos intracelulares se exponen durante el tráfico de vesículas sinápticas y son dianas de procesos mediados por anticuerpos o por células T. (C) Los anticuerpos dirigidos frente a moléculas de superficie son capaces de alterar la funcionalidad de los receptores a través de mecanismos, como, la internalización de receptores por endocitosis y reducción del número en la superficie, etc. Figura adaptada de la referencia [156].

## 7. Síndrome Opsoclonus-Mioclonus.

El síndrome Opsoclonus-Mioclonus (SOM) fue descrito por primera vez en 1962 por el Dr. Marcel Kinsbourne [157]. El SOM es un síndrome neurológico raro que se caracteriza por: movimientos oculares sacádicos multidireccionales con una frecuencia

y amplitud irregular sin un intervalo intersacádico (opsoclonus) [158] y movimientos involuntarios breves causados por la contracción de un músculo o grupo de músculos (mioclonus) [159]. En algunos casos el síndrome puede estar acompañado de ataxia o encefalopatía [160]. El opsoclonus se incrementa con los movimientos oculares voluntarios, persiste con los ojos cerrados y durante el sueño (aunque en algunos casos puede disminuir o incluso desaparecer) y tienen lugar normalmente en el plano horizontal [161]. Para confirmar el origen mioclónico de la discinesia con descargas breves (20-60 ms) se utiliza la electromiografía [160]. El debut del síndrome puede ser gradual (de semanas a meses con ataxia previa al SOM) o abrupto (de días a pocas semanas con ataxia, opsoclonus, mioclonus y otros trastornos del movimiento al mismo tiempo). Y el impacto funcional del mioclonus en los pacientes normalmente es grave [160].

La etiología de la enfermedad es muy variada, se han descrito asociaciones con: infecciones virales o bacterianas del sistema nervioso, encefalitis postinfecciosas; tumores o toxicidad por talio, litio y haloperidol, etc (Veánse las tablas anexas: **Tabla A1, A2 y A3**). Cuando los casos se asocian con un proceso paraneoplásico, se han descrito diversos tipos de cáncer que se diferencian en tres grupos principales: (1) Niños con neuroblastoma [162], (2) Adolescentes y mujeres jóvenes con teratoma de ovario [163], (3) Adultos con SCLC o cáncer de mama [164].

El SOM ocurre más frecuentemente en niños que en adultos [159, 165]. En los niños el SOM normalmente se desarrolla en los dos primeros años de vida (media 20 meses). En niños, la mitad de los casos de SOM se asocian con un neuroblastoma diferenciado, seguido, en menor frecuencia, de asociaciones con ganglioneuroblastoma o ganglioneuroma [166]. Los síntomas neurológicos aparecen previamente a la detección del tumor y, en algunos casos, la reaparición del síndrome se debe también a la recaída

del tumor [167]. La otra mitad de casos pediátricos son idiopáticos, pero algunos pacientes responden a tratamientos inmunomoduladores como: la hormona adenocorticotropa, Igs intravenosas y corticoesteroides orales o parenterales. Algunos casos se consideran parainfecciosos (por ejemplo, la encefalitis viral o bacteriana) o el resultado de estados tóxicos-metabólicos, y son típicamente benignos [168]. Los hallazgos neuropatológicos son inconsistentes, se han descrito cambios en el cerebelo con desmielinización, gliosis en la sustancia blanca y pérdida parcial de células de Purkinje en un niño con SOM y neuroblastoma [169], pero también casos sin cambios apreciables en el cerebelo [170]. No obstante, tras la resolución del SOM, muchos niños presentan graves secuelas: trastornos motores, verbales o de desarrollo intelectual [171]. En el mayor estudio enfocado a las secuelas en niños con SOM, el 79% de los pacientes había tenido episodios de irritabilidad, el 65% agitación, el 58% síntomas obsesivo-compulsivos, el 47% hiperactividad, el 25% síntomas depresivos y el 19% déficit de atención [172]. Los predictores clínicos que indican un mayor riesgo de secuelas a largo plazo son: el debut del síndrome a menor edad o con síntomas graves. Por tanto, iniciar el tratamiento precozmente es clave para minimizar las secuelas en los niños con SOM [173].

En adultos aproximadamente la mitad de los casos son idiopáticos [164], la segunda mayor causa es paraneoplásica [165]. El tumor más frecuente es el SCLC, pero también se han descrito asociaciones con: cáncer de mama, carcinoma medular de tiroides, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de útero, ovario, hueso, trompas de Falopio [164]. Inicialmente hay un cuadro prodrómico acompañado de: náuseas, vértigo, oscilopsia o dificultades para caminar. El componente universal del síndrome en adultos es el opsoclonus, pero puede acompañarse de otros signos neurológicos: ataxia (predominantemente truncal), mioclonus (en piernas, tronco, cabeza y palatal en unos pocos casos), disfunción postural y en la marcha (normalmente debido a la ataxia y/o

mioclonía), disartria, confusión, obnubilación o coma. Menos frecuentemente pueden presentar otros hallazgos neurológicos como: nistagmo, blefarospasmo, espasmo hemifacial. Los casos descritos de adultos son clínicamente similares a los casos pediátricos con un debut agudo o subagudo [164], pero hay diferencias en la eficacia del tratamiento y el pronóstico, ya que los niños mejoran con el tratamiento del tumor, corticoesteroides u hormona adenocorticotropa [159, 160, 164, 165]. En el caso del SOM en adultos, en algunos casos, el tratamiento de la neoplasia o la inmunoterapia produce mejoría [174-177]. No obstante, debido al bajo número de pacientes con SOM y a que muchas veces los pacientes reciben múltiples tratamientos, resulta difícil asignar beneficios a los tratamientos. Los pacientes con SOM paraneoplásico tienen peor pronóstico que los SOM que los idiopáticos. Al igual que en niños, el inicio temprano del tratamiento mejora el pronóstico [177]. Los predictores de peor pronóstico son: pacientes de mayor edad y la asociación más frecuente con encefalopatía [178, 179].

En los adultos existen menos anomalías neuropatológicas que en los niños y es más difícil asignar una zona anatómica concreta [164]. Los hallazgos neuropatológicos incluyen: infiltrados perivasculares mínimos en el tronco del cerebro y meninges [180], pérdida parcial de células de Purkinje y gliosis [181-183] y pérdida completa de las células de Purkinje, pérdida de las células en la capa granular y gliosis, neuronofagia, desmielinización peridentata, infiltrados de células mononucleadas en cerebelo y sus meninges [184]. La falta de correlación entre las características anatómicas y los síntomas hace suponer que la alteración estructural o funcional de diferentes zonas del SNC producen SOM [184]. Algunos autores han propuesto que alteraciones en redes de neuronas premotoras en la formación reticular pontina paramediana o rutas descendentes que controlan las neuronas omnipause podrían desencadenar SOM. Un estudio que apoya esta teoría es la ausencia completa de células omnipause en un paciente con SOM paraneoplásico [185]. Estas células interrumpen los parámetros antes

de los movimientos oculares en todas direcciones, tienen una tasa de disparo alta y producen la inhibición tónica de neuronas de disparo. Las células omnipause actúan como una puerta que desencadena los movimientos sacádicos cuando: (1) una señal inapropiada y prolongada dispara la señal inhibitoria de las células omnipause, (2) la señal tónica que excita las neuronas omnipause no es adecuada para mantener su tasa de descarga o (3) las células omnipause no pueden responder a la señal tónica [186]. Sin embargo, los experimentos de destrucción de las neuronas omnipause solo producen débiles movimientos sacádicos [187]. Por esta razón, otros autores sugirieron que el opsoclonus puede tener su origen en el cerebelo, en concreto en la desinhibición de la región oculomotora del núcleo fastigial [188]. Pese a que no hay evidencias de que el cerebelo inicie los movimientos sacádicos, por ejemplo los pacientes con degeneración cerebelosa paraneoplásica no manifiestan opsoclonus, si podría influir en la precisión de los movimientos [189].

Sobre la patogénesis del SOM se han propuesto varias explicaciones. Por un lado, el tumor puede secretar metabolitos tóxicos para el sistema nervioso, aunque no hay evidencias de que los metabolitos secretados sean tóxicos, ni de que el SOM sea causado por una toxina. Por otro lado, el SOM se asemeja a un proceso parainfeccioso del sistema nervioso. La fiebre, el dolor de cabeza y la pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo preceden a los síntomas de una infección respiratoria o gastrointestinal en niños o adultos sin cáncer identificable. También se asemeja a un modelo de síndrome neurológico paraneoplásico inmunomediado: con respuesta inflamatoria frente al tumor y sistema nervioso y los síntomas neurológicos responden a tratamientos inmunosupresores con hormona adrenocorticotropa o corticoesteroides [164, 190].

La etiología autoinmune en el SOM se sospecha debido a varias evidencias:

- El rápido desarrollo de la enfermedad.
- La existencia de cambios inflamatorios en el líquido cefalorraquídeo sugiere la activación de células B.
- El mejor pronóstico de supervivencia en pacientes con SOM y neuroblastoma sugiere una inmunidad antitumoral efectiva [191].
- La presencia de infiltrados linfocíticos en los tumores y linfocitos citotóxicos frente a neuroblastoma. También se han descrito casos de adultos con SOM paraneoplásico y anticuerpos que reaccionan al mismo tiempo con el sistema nervioso y con el cáncer causal.
- La buena respuesta a la inmunoterapia [160, 172].
- La presencia de anticuerpos neuronales de superficie [192, 193], aunque la identificación del autoantígeno responsable permanece sin dilucidar.

En el caso de los pacientes idiopáticos, la asociación en algunos casos de SOM en adultos con el virus de la inmunodeficiencia humana sugiere que en estos pacientes la causa es posiblemente autoinmune, dado que, la autoinmunidad es común en estos pacientes inmunodeprimidos [177].

Además de posibles mecanismos humorales y celulares implicados en la patogénesis, también podría existir un componente genético, electrofisiológico o neuroquímico [160]. Existen evidencias de mecanismos humorales en la patofisiología del SOM, por ejemplo, los estudios de autopsias raramente presentan degeneración neuronal o infiltrados de células T. Puede verse una lista de los anticuerpos y los tumores asociados en pacientes con SOM en la **Tabla I4**

**Tabla I4.** *Anticuerpos asociados con el Síndrome Opsoclonus-Mioclonus.*

Anticuerpos	Tumor asociado	Referencias
<b>Antígenos intracelulares</b>		
α-enolasa	N/D	[194]
Anti-mitocondriales	SCLC (adultos)	[195]
CV2/CRMP5	No (adultos)	[196]
EMA	No	[179, 197]
GAD65	SCLC y no células pequeñas	[122, 179, 198, 199]
Hu	Neuroblastoma (niños); Cáncer de pulmón (adultos)	[197, 200]
Ma2	Cáncer de pulmón y de estómago	[179]
Neurofilamentos	No	[201]
Neurolequina	No	[202]
Proteína de unión RNA HQK	Neuroblastoma	[200]
Proteína reguladora de splicing KH	N/D	[194]
Ri	Cáncer de mama (adultos)	[179, 203, 204]
Zic4	Cáncer de pulmón	[179]
<b>Antígenos de superficie</b>		
Epítipo HNK-1 * (IgM)	No	[179]
Familia miembros de la kinesina 5B, 21B	SCLC	[200]
Fosfatasa	Neuroblastoma	[205]
GABA(a)R	No	[206]
GABA(b)R	No	[207]
Gangliósido GQ1b	No	[179]
Gliadina (IgA)	N/D	[179]
NMDAR	Teratoma de ovario	[179, 208-210]
Proteína de poliposis adenomatosa colonica	No	[179]
Proteína tipo dipeptidil-peptidasa 6	No	[179]
Receptor de glicina	SCLC, mama y semioma testicular	[179]
Receptor de glutamato δ2	No	[211]
VGCC tipo N	SCLC	[212]
VGKC, por inmunoprecipitación	No	[213]

\*Anticuerpos tipo IgM frente a proteínas que contienen el epítipo HNK-1 *Human Natural Killer 1* glicosilado. Abreviaturas ANNA, anticuerpos antinucleares neuronales; CV2/CRMP5, *collapsin response mediator protein 5*; Ig, inmunoglobulina; GAD65, decarboxilasa ácido glutámico 65kDa; EMA, anticuerpos anti-endomisiales; GAD, *glutamate decarboxylase*; GABAR, receptor del ácido γ-aminobutírico tipo A o B (del inglés *gamma aminobutyric acid receptor*); N/D, Información no disponible; NMDAR, receptor de N-metil-D-aspartato (del inglés *N-methyl-D-aspartate receptor*); SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas (del inglés *small-cell lung-cancer*); VGCC, canales de calcio dependientes de voltaje (del inglés *voltage-gated calcium channels*); VGKC, canales de potasio dependientes de voltaje (del inglés *voltage-gated potassium channels*); Zic4, *zinc finger protein-4*.

Sin embargo, estos anticuerpos no son específicos del síndrome neurológico y, hasta la fecha, no se han detectado anticuerpos anti-neuronales comunes entre niños y adultos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Ri se ha descrito en adultos pero no en niños, lo que sugiere que posiblemente tengan rutas inmunopatogénicas diferentes [192, 200, 214].

Explorando los sueros de pacientes con SOM de diversos tipos (idiopático, asociado a SCLC o a neuroblastoma) con librerías de expresión se han encontrado antígenos variados que señalan a antígenos onconeuronales (proteínas Hu) y a la densidad post-sináptica como posible fuente de nuevos autoantígenos [200]. En un amplio estudio reciente con 114 pacientes adultos con SOM, además de anti-Ri en el 70% de los pacientes con cáncer de mama [179], se describieron anticuerpos de superficie conocidos en un 11% de los pacientes: anti- GlyR (más frecuente en pacientes con SCLC), anti-dipeptilpeptidasa X (DPPX) [179], anti-NMDAR [179, 208, 209], anti-GABA<sub>B</sub> [179, 207] y reactividad de IgM contra un epítipo glicosilado de superficie, conocido como *human natural killer-1*, en el líquido cefalorraquídeo de tres pacientes con cáncer de pulmón [179]. Este epítipo es similar al identificado por anticuerpos de IgM contra la proteína MAG, pero también se encuentra en otras proteínas como: moléculas de adhesión, tenascinas o integrinas. En otros estudios se han descrito anticuerpos anti-canales de calcio tipo N [212] o anti-GABA<sub>A</sub> [206]. Sin embargo, la búsqueda de anticuerpos de superficie conocidos en adultos con SOM tiene un valor clínico limitado: algunos pacientes presentan síndromes encefalíticos severos, por lo que podrían indicar respuestas inmunitarias complejas no relacionadas con el SOM o ser un reflejo de la activación inmunitaria. Otros anticuerpos son teóricamente patogénicos, por ejemplo, los receptores GlyR, ya que uno de los neurotransmisores presentes en la ruta de las neuronas omnipause es la glicina [179]. En el caso de los niños con SOM y neuroblastoma, aunque no se ha encontrado un antígeno común, los niños con SOM y neuroblastoma tienen más anticuerpos anti-neuronales en el suero que

niños que solo tienen neuroblastoma [215]. Los anticuerpos de niños con SOM se unen a la superficie de células granulares de cerebelo por citometría de flujo [193] y ejercen un efecto citotóxico y pro-apoptótico, a través de un mecanismo vía fosforilación ERK-1/2 en la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos [216]. Sin embargo, la unión con moléculas de superficie y los efectos patogénicos de los anticuerpos no se replica en adultos con SOM, lo que apoya la posibilidad de inmunidad heterogénea [217]. Se ha descrito un caso de un niño con SOM y ataxia con anticuerpos anti-NMDAR con síntomas típicos de encefalitis anti-NMDAR [210]. Aunque no se ha encontrado el anticuerpo o anticuerpos responsables en los niños con SOM, el inmunofenotipo en el líquido cefalorraquídeo es muy interesante: la población de células B (CD19<sup>+</sup>) es de más de un 29% frente al 1% normal, la población de células T  $\gamma/\delta$  también está aumentada y la población de células T (CD4<sup>+</sup>) está disminuida. El incremento de células B es muy llamativo clínicamente, porque indica una producción potencial de autoanticuerpos en el SNC o bien un aumento de la presentación de antígenos a las células T. Además, las células T  $\gamma/\delta$  se consideran la forma fetal y son capaces de reconocer antígenos directamente sin presentación [218]. Además, existen citoquinas inflamatorias marcadoras de células B elevadas en pacientes con SOM [219, 220]. Los niveles de estas citoquinas se correlacionan con: la severidad del SOM, la frecuencia de células B y la presencia de bandas oligoclonales [221], lo que apoya la implicación del componente humoral en el síndrome.

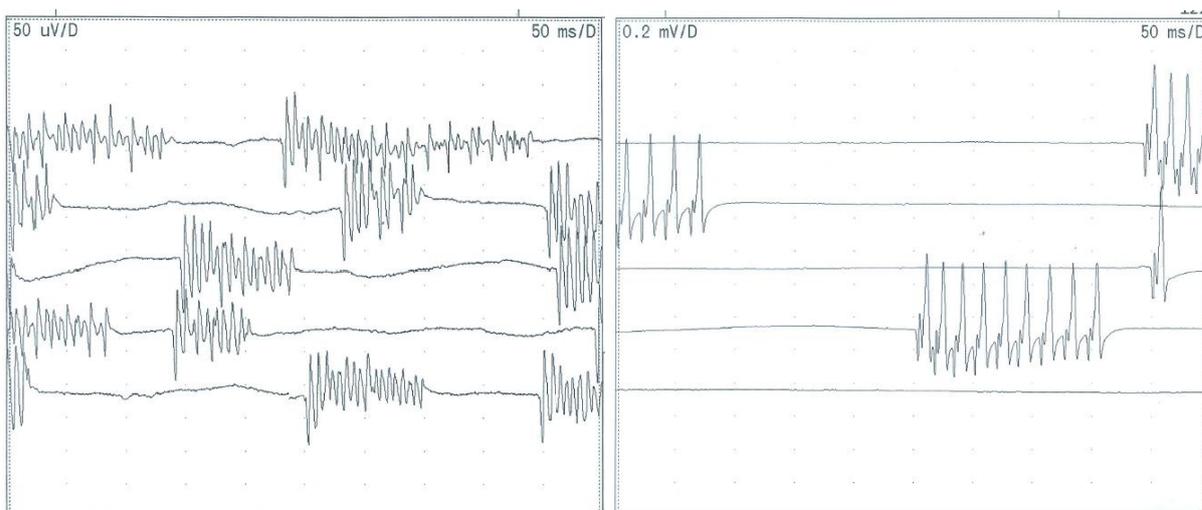
## **8. Neuromiotonía.**

El “síndrome de hiperexcitabilidad de nervio periférico” se caracteriza por una actividad muscular espontánea con origen en el nervio periférico, que se agrava con la contracción muscular inducida o voluntaria [222]. Para enfatizar la base neurogénica de esta actividad muscular continua, a este síndrome también se le denomina

neuromiotonía adquirida (NMT) [223]. El síndrome fue descrito por primera vez en 1961 por el Dr. Hyam Isaacs en dos pacientes con rigidez muscular progresiva y persistente con descargas espontáneas de la unidad motora en los estudios de electromiografía [224]. A diferencia de la miotonía, los pacientes no responden a una estimulación mecánica directa y sus músculos presentan una actividad eléctrica espontánea de alta frecuencia durante el reposo, que aumenta con la contracción voluntaria y persiste durante más de 30 segundos tras el cese del estímulo. En la descripción original, el Dr. Isaacs propuso que el síndrome podría estar causado por un defecto adquirido en la segunda motoneurona o en la unión neuromuscular, independiente de las raíces proximales y del SNC, y también excluyó la posibilidad de un defecto en la membrana muscular [224]. Estudios electromiográficos posteriores refuerzan esta hipótesis propuesta originalmente, ya que la NMT es más evidente a nivel distal que proximal [225].

Los hallazgos clínicos de la NMT o “síndrome de Isaacs” incluyen: fasciculaciones (espasmos musculares aleatorios y espontáneos de un grupo de fibras musculares que producen el movimiento de la capa superficial de la piel o mucosa [226]), calambres (contracción muscular involuntaria y dolorosa), mioquimia (movimientos ondulantes visibles sobre la superficie muscular [226]) y pseudomiotonia (retraso de la relajación tras una contracción muscular) [222, 223, 227]. Los calambres musculares que presentan los pacientes con NMT empeoran con la contracción muscular voluntaria y los espasmos musculares abarcan un amplio espectro de grupos musculares. La debilidad muscular no es un síntoma común y la fuerza generalmente es normal. Como resultado de una actividad muscular continua, los pacientes presentan hipertrofia muscular, especialmente, en los músculos de la pantorrilla o en los músculos del antebrazo o la mano [228]. El grado de hipertrofia se corresponde con la gravedad de la hiperactividad en un grupo de músculos individuales y normalmente es bilateral [229].

La pseudomiotonía raramente es el primer síntoma y solo aparece aproximadamente en un tercio de los pacientes tras cerrar la mano, los ojos o la mandíbula [230, 231]. La base electrofisiológica de la NMT, es clave para el diagnóstico de la enfermedad. Los pacientes presentan potenciales de unidad motora (PUM) con: dobletes, tripletes o trenes de descarga con una alta frecuencia intradescarga. También pueden presentar fasciculaciones (descargas espontáneas en una unidad motora) y fibrilaciones (descargas espontáneas en una fibra muscular) [222]. Se considera una descarga neuromiotónica cuando la frecuencia intradescarga esta entre 150-300 Hz. Por otro lado, las mioquimias son grupos de descargas espontáneas, rítmicas con dobletes, tripletes o multipletes de PUM (de mismo tamaño y morfología) en un corto periodo de tiempo (pocos segundos) con frecuencias entre 40-150 Hz [227]. La diferencia entre las descargas neuromiotónicas y mioquímicas puede verse en la **Figura I3**. Estas anomalías eléctricas ocurren solas o en combinación y suelen ser más prominentes a nivel distal de los músculos de las piernas [232].



**Figura I3.- Descargas neuromiotónicas (panel de la izquierda) y mioquímicas (panel de la derecha).**

Imágenes cedidas por la Dr. M<sup>a</sup> José Chumillas, Hospital La Fe.

Algunos pacientes con NMT también sufren: parestesias o entumecimiento (que implica una afectación de nervios sensoriales), hiperhidrosis (que podría ser una representación de una alteración del sistema autonómico o ser secundario a la hiperactividad muscular) [225]. En algunos casos la NMT también se asocia con alteraciones del SNC: cambios del estado de ánimo, trastornos del sueño o alucinaciones [222, 233-235]. La combinación de NMT, manifestaciones autonómicas (hiperhidrosis, taquicardia...) y del SNC (confusión, agitación ansiedad, insomnio y alucinaciones) se denomina síndrome de Morvan [235].

El síndrome de hiperexcitabilidad de nervio periférico puede ocurrir secundario a enfermedades hereditarias o adquiridas que afectan a las motoneuronas y axones. Estos trastornos se diferencian en su presentación clínica, características electrodiagnósticas e inmunitarias por lo que es necesario distinguir procesos inmunomediados de otros no inmunomediados (toxinas que afectan al asta anterior, procesos degenerativos de motoneuronas o enfermedades genéticas) [225, 236]. Véase la lista de entidades clínicas asociadas con la NMT en la **Tabla I5**.

**Tabla I5.** Entidades clínicas que deben considerarse ante la sospecha de síndrome de Isaacs o NMT. Adaptada desde [225].

<b>Entidades clínicas</b>
Afectación del SNC (encefalopatía, dolor de cabeza, insomnio y/o alucinaciones); Síndrome de Morvan
Neuropatía periférica idopática
<b>Enfermedades autoinmunes</b>
Enfermedad celíaca
Enfermedad reumatoide inducida por el tratamiento con penicilamina
Hipertiroidismo, hipotiroidismo
Lupus eritematoso sistémico
Miastenia gravis
Polirradiculoneuropatía desmielinizante crónica
Síndrome Guillain-Barré
<b>No inmunomediada</b>
Degeneración del asta anterior
Neuropatía periférica idiopática
Oro
Toxinas: herbicidas, insecticidas, tolueno, alcohol
<b>Mutaciones genéticas</b>
Ataxia episódica familiar de tipo I o esporádica (mutaciones en <i>KCNA1</i> )
Neuropatía hereditaria motora y sensitiva tipo 1 <sup>a</sup> o neuropatía hereditaria con parálisis por presión (mutaciones en <i>PMP22</i> )
<b>Otras enfermedades hereditarias</b>
Atrofia muscular espinal
Otras neuropatías hereditarias (motoras o sensitivas-motoras) (mutaciones en <i>HINT1</i> )
Síndrome de Schwartz-Jampel

Abreviaturas: *HINT1*, histidine triad nucleotide-binding protein 1; *KCNA1*, potassium voltage-gated channel subfamily A member 1; *PMP22*, peripheral myelin protein 22; *SNC*, sistema nervioso central.

Durante décadas, se ha especulado sobre el papel de los canales de potasio dependientes de voltaje (VGKCs, del inglés *Voltage-gated potassium channels*) en la patofisiología de la NMT. Los VGKCs están compuestos por cuatro subunidades transmembrana  $\alpha$  y cuatro subunidades intracelulares  $\beta$  alrededor de un poro central. Los genes de la subunidad  $\alpha$  determinan la subfamilia VGKC, que tiene ocho miembros en humanos (Kv1.1-Kv1.8) [237]. Para la detección de anticuerpos frente a VGKCs se utiliza una técnica de radioinmunoensayo con extractos de cortex de mamíferos incubados con dendrotoxina (veneno de la serpiente *Dendroaspis sp.* que bloquea los VGKCs) marcada con  $I^{125}$  [238]. La relación entre los VGKCs y la NMT se basó en estudios clínicos, *in vitro* y pruebas farmacológicas. Los estudios *in vitro* de supresión de corrientes de potasio en células incubadas con sueros de pacientes de NMT [239] o las pruebas farmacológicas de bloqueo de canales de potasio, con tetraetilamonio y 3,4-diaminopiridina a bajas dosis, produjeron un incremento de la excitabilidad nerviosa similar a la observada en los pacientes [240]. Aproximadamente la mitad de los sueros de pacientes con NMT tenían anticuerpos anti-VGKCs e incluso en un paciente se correlacionó la disminución del nivel de anticuerpos anti-VGKC con la mejoría clínica y electromiográfica tras la plasmaféresis y tratamiento inmunosupresor [241]. En los estudios de *patch clamp* usando células transfectadas con Kv1.1 y Kv1.6 los anticuerpos de los pacientes eran capaces de suprimir las corrientes de potasio [242] o por inmunohistoquímica en oocitos de *Xenopus laevis* previamente transformados con VGKCs humanos incluso se llegó a describir la existencia de autoanticuerpos en más de un 85% de pacientes con NMT frente a diferentes VGKCs (Kv1.1, 1.2 y 1.6) [231]. Sin embargo, estos estudios nunca consiguieron replicarse en otros laboratorios. Además de existir una gran variabilidad inter-estudio en cuanto a la proporción de pacientes con NMT y anticuerpos anti-VGKCs, desde un 38-54% [225, 243], la extensión de la técnica de radioinmunoensayo también asoció los anticuerpos frente a VGKCs con el

síndrome de Morvan [234] o la encefalitis límbica sin manifestaciones de NMT [244]. Así en 2010, a través de estudios diferentes se demostró que no existía una antigenicidad directa frente a proteínas del canal VGKC, sino que los anticuerpos de estos pacientes se unían a proteínas sinápticas y axonales coprecipitadas con la solubilización de VGKCs. Los estudios de inmunoprecipitación directa con sueros y líquido cefalorraquídeo de pacientes con altos títulos de VGKCs, detectaron anticuerpos frente dos proteínas que forman parte del complejo VGKCs: LGI1 y Caspr2.

Los anticuerpos dirigidos frente a LGI1 son más frecuentes en pacientes con encefalitis límbica, epilepsia y en unos pocos casos con síndrome de Morvan [245, 246], mientras que los anticuerpos anti-Caspr2 son más frecuentes en pacientes con NMT y síndrome de Morvan [246-250]. LGI1 se expresa en el hipocampo y neocortex, es una glicoproteína secretada desde la terminal presináptica que se asocia con Kv1s y otras proteínas neuronales, tiene dos receptores proteínas que contienen un dominio desintegrina y dominio metaloproteasa 22 y 23 y se localizan post- y pre-sinápticamente respectivamente [245]. Las mutaciones en LGI1 se asocian con epilepsia familiar del lóbulo temporal lateral [251]. Por otro lado, Caspr2 es una proteína de membrana con un dominio extracelular grande que actúa como una molécula de adhesión esencial para la localización de los VGKCs en las regiones yuxtaparanodales, a través de la interacción con la proteína contactina-2 [246]. Las mutaciones en Caspr2 se asocian con epilepsia focal y ausencia de reflejos tendinosos profundos [252]. En la mayoría de pacientes con altos títulos de anti-VGKCs (>400 pM) los anticuerpos están dirigidos contra LGI1 y Caspr2. La mayoría de los pacientes con títulos altos tiene encefalitis límbica, y en menor frecuencia: NMT, Síndrome de Morvan y epilepsia. La expresión de LGI1 es menor en los nervios periféricos que Caspr2 y los anticuerpos anti-LGI1 muy pocas veces han sido descritos en pacientes que presentan únicamente NMT [246, 253]. Existe una gran diversidad de presentaciones clínicas, ya que ninguno de los

autoanticuerpos conocidos tiene una presentación neurológica específica. Así, Caspr2 aparece en un 21% de pacientes con hiperexcitabilidad motora y solo un 6.5% tienen LGI1, pero el 79% de los pacientes LGI1 y el 29% de los pacientes Caspr2 tienen también afectación cognitiva y convulsiones. Además, Caspr2 también aparece en casos de dolor neuropático [254], o en casos de: debilidad, fasciculaciones y disfunción bulbar similar a una enfermedad de la motoneurona [247]. Además, los pacientes con encefalitis límbica y anticuerpos anti-LGI1 presentan una mayor tasa tumoral (10-15%) [255-257] y aproximadamente el 80% responden a inmunoterapia [249]. Los títulos bajos de los anti-VGKC (100-400 pM) deben considerarse con cautela, ya que solo parecen significativos en pacientes con hiperexcitabilidad de nervio periférico y son comunes en enfermedades neurodegenerativas u otras sin una clara base autoinmune [253]. Por ejemplo, existen bajos niveles de VGKCs (<400pM) en un 5% de pacientes sin ningún trastorno neurológico [258], y en muchos otros síndromes clínicos (epilepsia, dolor neuropático, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob) [253, 254, 259, 260]. Los VGKCs detectados por radioinmunoensayo parecen no tener la validez clínica que se pensaba, ya que solo una minoría de los pacientes con NMT son positivos al inicio. La mitad de los pacientes positivos para VGKC (>100 pM) no tienen anticuerpos frente a LGI1 y Caspr2, de ellos solo el 28% se relacionan con inflamación autoinmune, y no se diferencian del grupo de pacientes VGKC negativo. Además, la respuesta a inmunoterapia en pacientes sin VGKC y con VGKC y antígeno desconocido es similar [249]. La falta de relevancia clínica de los anticuerpos anti-VGKC refleja que en lugar del radioinmunoensayo como *screening* actualmente es mejor utilizar test diagnósticos de inmunofluorescencia con suero dirigidos contra células transfectadas que expresan los antígenos conocidos LGI1 o Caspr2, ya que incluso existen casos positivos para LGI1 o Caspr2 que son negativos para VGKCs [248]. Es muy importante destacar que en muchos casos con anticuerpos frente a VGKCs y una presentación primaria en el

sistema nervioso periférico, los autoantígenos diana específicos permanecen desconocidos [246].

Varias evidencias clínicas sugieren una etiología autoinmune en la NMT adquirida:

- La asociación con otras enfermedades autoinmunes: MG con o sin timoma, síndrome de Guillain-Barré, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedad de Addison con neuropatía desmielinizante, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad celíaca [222, 225, 261].
- La presencia de otros autoanticuerpos, como: altos títulos de anti-AChR, anti-nucleares (ANA), anti-músculo estriado, anti-GAD65 [225]. Algunos autores sugieren que la presencia de anticuerpos frente a múltiples antígenos neuromusculares puede tener efectos autoinmunes en la arborización intramuscular de nervios motores y afectar a la conducción nerviosa [262]. También se han descrito recientemente otros anticuerpos de superficie, como: el receptor de netrina *deleted in colorectal carcinoma* (DCC) en siete pacientes con NMT o síndrome de Morvan y cuatro pacientes con encefalitis límbica (en todos los casos hay también anti-Caspr2 o LGI1), DPPX y el receptor de LGI1 ADAM23. Falta por determinar si realmente tienen un papel patogénico [263].
- La asociación con síndrome de Guillain-Barré y CIDP puede indicar un daño de la membrana de nervio periférico directamente o a través de mecanismos efectores inmunitarios. Algunos autores señalan la coincidencia de neuropatía axonal y NMT como un punto importante en cuanto a los límites nosológicos del “síndrome de Isaacs”. Es posible que la neuropatía

sea la causa de la hiperexcitabilidad de nervio periférico [227] o que el daño inmunitario a proteínas de la membrana axonal conduzca a la neuropatía periférica [225]. Por ejemplo, se ha descrito un paciente, con encefalitis límbica y un síndrome de hiperexcitabilidad de nervio periférico sin evidencias de neuropatía periférica en el debut de la enfermedad, que acabó desarrollando una axonopatía motora subaguda. Esto sugiere que un proceso autoinmune frente a antígenos neuronales finalmente podrían producir la degeneración del axón [227].

- Algunos pacientes con NMT presentan bandas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo y responden a inmunoterapia (plasmaféresis) [264].
- Demostración del efecto patogénico de IgG por transferencia pasiva en ratón de plasma o IgGs purificadas de un paciente con NMT. Mayor resistencia *in vitro* a la d-tubocurarina (un alcaloide que produce bloqueo neuromuscular compitiendo con la acetilcolina) en preparaciones del diafragma y nervio frénico del ratón inyectado con el plasma o IgGs purificadas de pacientes con NMT [264], ya que se incrementa la liberación de acetilcolina [241].

La hiperexcitabilidad de nervio periférico puede aparecer en un contexto paraneoplásico con: timoma con o sin MG, SCLC con o sin neuropatía periférica, adenocarcinoma, linfoma de Hodgkin, plasmacitoma con paraproteinemia de IgM [225, 265], timoma [266], cáncer de ovario [267]. Hace falta más información específica de la frecuencia de tumores en pacientes con NMT, pero según un estudio: el 16% de pacientes con síndromes de hiperexcitabilidad de nervio periférico (incluyendo NMT, síndrome de Morvan, síndrome de fasciculaciones y calambres) presenta una asociación tumoral. Muchos de estos pacientes con NMT son seropositivos para diferentes anticuerpos, por

lo que podría existir una relación entre la autoinmunidad y el tumor, como se ha visto en otros síndromes paraneoplásicos [243]. Los anticuerpos anti-Caspr2 se asocian con un tumor en un 40% de los casos con NMT, siendo principalmente timomas [248].

Aproximadamente el 50% de los pacientes con timoma tienen MG paraneoplásica, pero otros desarrollan miositis o NMT. La asociación con timoma es particularmente importante desde el punto de vista inmunológico.

## 9. Autoinmunidad y timomas.

El término timoma se refiere a una neoplasia de las células epiteliales del timo. Es relativamente raro, con una incidencia aproximada de 0.15 por 100,000 personas/año [268]. Existe una evidencia clara de la relación del timoma con enfermedades autoinmunes: un 30% de pacientes con timoma o post-timectomía presenta alguna enfermedad autoinmune. En más de un 50% de los pacientes con timoma se diagnostican con dos enfermedades autoinmunes concomitantes, en algunos casos, tras la timectomía la enfermedad remite [269]. La MG es la asociación más frecuente, aproximadamente un 25% de los pacientes con MG desarrollan un timoma [270]. Otras manifestaciones neurológicas que se asocian con el timoma con menor frecuencia son: la disautonomía, la encefalitis, la epilepsia y más raramente: la hiperexcitabilidad de nervio periférico, la neuropatía periférica, la miopatía, la neuropatía craneal, la mielopatía y trastornos del movimiento [271]. El tipo de tumor que se asocia más frecuentemente con enfermedades autoinmunes es el tipo B de la clasificación histológica de la Organización mundial de la salud (OMS), véase la **Tabla I6**.

**Tabla I6.** *Enfermedades autoinmunes asociadas con timoma, frecuencia y tipo de timoma asociado* (según la clasificación de la OMS). Adaptada desde [272].

Enfermedad autoinmune	Frecuencia	Tipo timoma asociado
<b>Cutáneas</b>		
Alopecia areata	0.5%	B1, B2, B3
Pénfigo*	<1%	A, AB
<b>Endocrinas</b>		
Diabetes de tipo 1	<1%	B1, B2, B3
Enfermedad de Addison	<1%	B1
Enfermedad de Graves	<1%	B2
Tiroiditis de Hashimoto	<1%	B1,B2
<b>Gastrointestinal</b>		
Colitis	<1%	A
Disfunción de la motilidad gastrointestinal	<1%	B1, B3
Hepatitis	<1%	B2
<b>Hematológicas</b>		
Agranulocitosis	<1%	A>otros
Anemia aplásica	<1%	A, B2
Aplasia de glóbulos rojos pura*	4%	AB>B2, B1>A, B3
Hipo-γ-globulinemia	5-20%	B2>AB, B1, B3>A
<b>Neuromusculares</b>		
Dermatomiositis	<1%	B2
Enfermedad del músculo ondulante	<1%	B2
Miastenia gravis*	15%	B2, B1, B3>AB>A
Miocarditis	<1%	B1
Miositis	1-5%	B1, B2
Neuromiotonía	3%	B2, B3, AB
<b>Sistémicas</b>		
Artritis reumatoide	<1%	B1, B3
Enfermedad injerto contra huésped	<1%	A, B2, B3
Lupus eritematoso sistémico*	2%	B2>AB, A
Sarcoidosis	<1%	A, B1
Síndrome de Sjogren	<1%	B1
<b>SNC</b>		
Degeneración cerebelosa	<1%	A, AB
Encefalitis	<1%	A, B1, B2, B3
Opsoclonus-mioclonus	<1%	B1

\*Remisión post-timectomía, en el caso de la miastenia gravis se observa reducción de los niveles de anti-AChR en el suero en pacientes jóvenes [273]. Abreviaturas utilizadas: SNC, sistema nervioso central.

Algunos autores señalan que la clasificación histológica de la OMS basada en criterios microscópicos (**Tabla A4**) se correlaciona con el estado clínico y predice el pronóstico de los pacientes. Por ejemplo, el pronóstico de los timomas A y AB es mejor que el de los tipos B y C, y existe una transición de tipo A a C a medida que avanza la progresión del timoma. Sin embargo, el estadio de Masaoka (**Tabla A5**) se basa en criterios microscópicos o macroscópicos y se relaciona significativamente con la recurrencia del tumor, independientemente de la clasificación histológica [274]. Por consiguiente, el estadio de Masaoka es útil para predecir el pronóstico clínico [275].

Se han descrito muchos autoanticuerpos asociados con timoma: GAD65, VGKCs, CRMP5 (CV2), AChR o Hu [276, 277]. Sin embargo, se han descrito otros autoanticuerpos potencialmente patogénicos frente a proteínas de superficie en pacientes con timoma, por orden de frecuencia: anti-AMPA en pacientes con encefalopatía con manifestaciones límbicas o corticales, anti-aquaporin 4 (AQP4) en pacientes con neuromielitis óptica o mielitis transversa longitudinal extensa, anti-GABA(a)R en un paciente con neuropatía periférica y otro con MG e hipermotilidad gastrointestinal, anti-GlyR en dos pacientes asintomáticos. Por el contrario, anti-NMDAR, DPPX, mGluR1 o mGluR5 son predictores negativos de la presencia de timoma, al igual que anti-VGCC [271]. Estas asociaciones ponen de manifiesto el potencial del timoma para iniciar un proceso de autoinmunidad frente al sistema nervioso, especialmente en el caso de proteínas de la familia nicotínica de AChR. Es posible que la expresión de autoantígenos neuronales y musculares en el tumor desencadena una respuesta cruzada frente a estos antígenos [278].

### 9.1. Teorías sobre mecanismos de rotura de tolerancia relacionados con el timoma.

Los pacientes con MG desarrollan otras enfermedades autoinmunes post-timectomía [279]. El timoma parece iniciar el proceso de autoinmunidad, así, el trasplante de tejido tímico de pacientes con MG en ratones inmunodeprimidos produce la aparición de anticuerpos anti-AChR detectables en suero al cabo de una o dos semanas [280]. La arquitectura del timo, como hemos visto anteriormente, es esencial en el mantenimiento de la tolerancia central y también es un órgano que ayuda a la producción de células T reguladoras capaces de controlar la tolerancia en la periferia. Así pues, el mecanismo más razonable para desencadenar la autoinmunidad es un proceso de alteración de los mecanismos de tolerancia del sistema inmune. Algunas teorías propuestas para explicar la rotura de la tolerancia inmunitaria son las siguientes:

- **Teoría de células T inmaduras:** El timoma tiene una organización celular similar a la del timo normal, pero los linfocitos T corticales derivados del timoma son inmaduros (expresan Tdt<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) y hay un menor número de células T maduras que expresan solo CD4<sup>+</sup> [281]. La “teoría del escape” propone que los linfocitos T en el microambiente tumoral evaden el paso por áreas medulares, en las que se induce la autotolerancia por células dendríticas, y escapan a la circulación convirtiéndose en células autorreactivas [282]. En la MG existe una alteración de la exportación con células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> sensibles a antígenos expresados en el timoma, con potencial para actuar en la periferia [283, 284]. También presentan una alteración de la función de selección de la médula, ya que los timomas de pacientes con MG tienen un número de células T inmaduras CD4/CD8 doble positivas significativamente mayor y menos expresión de moléculas HLA-DR. Todos estos factores contribuyen a un proceso de selección

negativa defectuoso y la consecuente generación de células autorreactivas [285].

- **Teoría neoplásica-genética:** Las células neoplásicas que proliferan rápidamente están más expuestas a mutaciones genéticas y fallos en el reordenamiento de los genes de receptor de células T [279]. Esta teoría se ampara en la existencia de diferencias genéticas de células corticales del timoma comparadas con timo normal [286]. Además, las células epiteliales del timoma también expresan menos moléculas HLA-DR, lo que podría afectar a la selección positiva y favorecer la autorreactividad [287]. Aunque la expresión de MHC de clase II depende del tipo de tumor y no existe correlación con la MG [288], en pacientes con MG y timoma hay una expresión más baja de [289, 290]: *AIRE* y *FOXP3* (escurfina del inglés, *Forkhead box P3*). *AIRE* regula la expresión de autoantígenos tejido específicos en la médula. Las células T se inmunizan frente antígenos *AIRE*-independientes, por ejemplo, antígenos musculares de células mioides detectadas en el timo [291]. *FOXP3* es un factor de transcripción necesario para la maduración de células T reguladoras, que mantienen la tolerancia en la periferia. Por tanto, una menor expresión de estos genes podría favorecer también la autorreactividad.
- **Teoría celular y humoral combinada:** La exportación de células T a la periferia está alterada y supone un proceso crítico en el desarrollo de autoinmunidad. Sin embargo, también se necesita que estas células activen a las células B productoras de anticuerpos. La transformación de inmunidad celular a humoral ocurre a través de células T CD4<sup>+</sup> potencialmente autorreactivas. Estas células gradualmente convierten células T de la

periferia en una mezcla de células T susceptibles de autoinmunidad, capaces de activar a células B para producir autoanticuerpos. Un ejemplo que apoya esta teoría es la existencia de células T CD4<sup>+</sup> autoantígeno específicas intratumorales, que podrían exportarse a la periferia, en pacientes con MG [284, 292]. Los pacientes con MG y timoma tienen anticuerpos anti-citoquinas, como: el interferón  $\alpha$  o la IL 12, que podrían influir la respuesta inmunitaria [293].

Aunque el mecanismo que induce la autorreactividad debe ser elucidado todavía, es evidente la relación del timoma con la autoinmunidad. Comprender los mecanismos por los que se desencadena la autoinmunidad supondría un avance en el conocimiento y prevención de las enfermedades autoinmunes.



## ***OBJETIVOS***



## **1. OBJETIVO GENERAL.**

El objetivo general del presente trabajo es identificar nuevos antígenos de superficie neuronal en pacientes con síndromes neurológicos de hiperexcitabilidad motora (síndrome opsoclonus-mioclonus y neuromiotonía), así como elucidar los mecanismos de pérdida de tolerancia inmunitaria en pacientes con timoma que desarrollan síndromes neurológicos paraneoplásicos.

## **2. OBJETIVOS EN LAS ENFERMEDADES OBJETO DE ESTUDIO.**

### **2.1 SÍNDROME OPSOCLONUS-MIOCLONUS .**

Estudios previos apuntan a que el síndrome opsoclonus-mioclonus es una enfermedad de origen autoinmune. Teniendo en cuenta que el/los antígeno(s) responsable(s) de la enfermedad permanecen desconocidos, se ha planteado como objetivo de esta tesis:

- Identificar nuevos antígenos de la superficie neuronal en niños con opsoclonus-mioclonus asociado a neuroblastoma o adultos con opsoclonus-mioclonus idiopáticos.

### **2.2 NEUROMIOTONIA.**

Diversos experimentos han demostrado la presencia de anticuerpos circulantes frente a antígenos de la superficie celular. A pesar de que los datos clínicos y experimentales sugieren una disfunción de VGKCs, solo un porcentaje variable de pacientes presenta anticuerpos frente a proteínas del complejo: Caspr2 o en menos frecuencia LGI1.

Debido a que su frecuencia y utilidad diagnóstica es desconocida y a que no se conoce si otros anticuerpos están implicados, planteamos los siguientes objetivos en esta tesis:

- Identificar nuevos antígenos de la superficie neuronal axonal en pacientes con neuromiotonía asociada a timoma.

- Evaluar la capacidad de predecir timoma de los autoanticuerpos.
- Describir las principales características clínicas y electrofisiológicas de los pacientes con neuromiotonía seroposivos.

### **2.3 TIMOMA.**

El timo es un órgano clave en el mantenimiento de la autotolerancia central y periférica.

Debido a que en muchos pacientes con timomas se desarrollan enfermedades neurológicas autoinmunes y a que los mecanismos por los que maduran las células T en el timoma no son bien conocidos, planteamos los siguientes objetivos en esta tesis:

- Describir la histología y expresión de marcadores inmunitarios en muestras de timoma de pacientes con miastenia gravis paraneoplásica (con o sin neuromiotonía).
- Evaluar la expresión de los antígenos implicados en muestras de timoma en pacientes con neuromiotonía y timoma.
- Valorar la relación de los marcadores con la pérdida de tolerancia inmunitaria en los pacientes.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***



## **1. Pacientes y controles utilizados.**

### **1.1. Pacientes y controles utilizados para los estudios de SOM.**

Para el estudio previo de la inmunoreactividad de los pacientes con SOM se utilizaron: pacientes adultos con SOM idiopático (n=2) y pacientes pediátricos con SOM y neuroblastoma (n=14). Como controles positivos se usaron el suero de un paciente con encefalitis y anticuerpos anti-Hu o el líquido cefalorraquídeo de un paciente con encefalitis y anticuerpos anti-NMDAR o anti-AMPA positivos, y como controles negativos, sueros de individuos sanos (n=10).

Para los estudios de inmunoprecipitación se seleccionaron tres pacientes pediátricos con SOM y neuroblastoma con reactividad de IgG en la superficie de la línea de neuroblastoma humano derivada de tejido neural de médula ósea (SH-SY5Y) y dos pacientes adultos con SOM idiopático. Para los estudios con células HEK293T transfectadas para expresar las proteínas de interés identificadas se usaron: (1) Pacientes pediátricos con SOM (n=10), (2) Pacientes pediátricos y neuroblastoma (n=14), (3) Pacientes adultos idiopáticos con SOM (n=10), (4) Pacientes adultos paraneoplásicos (n=10, de ellos cuatro con SCLC, tres cáncer de mama, uno con cáncer de pulmón de células no pequeñas, uno con cáncer de testículo y uno con cáncer renal), (5) Sueros de individuos sanos (n=3), obtenidos del “Biobanco del Hospital Universitario y Politécnico La Fe”, Valencia, España.

#### **1.1.1. Criterios clínicos de inclusión de los pacientes con SOM.**

Los pacientes con SOM se seleccionaron en base a una historia clínica que cumplía los siguientes criterios:

- Presencia de movimientos oculares anormales compatibles con opsoclonus, con o sin la presencia de mioclonus, ataxia y encefalopatía.

- Debut subagudo y exclusión de otras enfermedades relacionadas con SOM (genéticas, tóxicas, metabólicas) [200].
- En los casos pediátricos: edad menor de siete años y neuroblastoma descubierto en el debut de la enfermedad o en poco tiempo tras el debut.

## 1.2. Pacientes y controles utilizados para los estudios de NMT

Para realizar un *screening* previo de inmunoreactividad sobre secciones sagitales de cerebro/cerebelo de rata se utilizaron: sueros de pacientes con NMT (n=38), descritos previamente en la referencia [227], como control positivo el suero de un paciente con anticuerpos IgM anti-MAG y como controles negativos sueros de individuos sanos (n=71), obtenidos del “Biobanco del Hospital Universitario y Politécnico La Fe”, Valencia, España.

Para los estudios de inmunoprecipitación se seleccionaron: un paciente con NMT, neuropatía axonal y MGUS, tres pacientes con NMT, MG y timoma (paciente 5 y grupo paraneoplásico de la referencia [227], respectivamente) y tres pacientes con NMT aislada. Como muestras control se incluyeron los sueros de pacientes de los siguientes grupos: (1) Sueros de individuos sanos (n=3), obtenidos del Biobanco del “Hospital Universitario y Politécnico La Fe”, Valencia; (2) Pacientes con encefalitis y anticuerpos IgG<sub>4</sub> anti-*IgLON family member 5* (IgLON5) (n=3) [294]; (3) Niños con SOM y neuroblastoma (n=3) [295].

Para detectar la presencia de anticuerpos frente las proteínas de interés, se usaron células HEK293T transfectadas para expresar las proteínas de interés identificadas (ver después) incubadas con sueros de:

- (1) Pacientes con NMT (n=46, 40 de la “Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Hospital Universitario y Politécnico La Fe”, Valencia, España y seis del “*French*

*Reference Center on Paraneoplastic Neurological Syndromes, Lyon, Francia*” [296]); (2) Pacientes con MG y anticuerpos anti-AChR (n=43); (3) Pacientes con timoma sin síntomas neurológicos (n=9); (4) Controles (n=219), incluyendo: (i) otras enfermedades neurológicas: ataxia subaguda (n=10), ataxia crónica de origen desconocido (n=39), síndromes desmielinizantes del SNC (n=20), síndrome de Guillain-Barré (n=20), enfermedad de Alzheimer (n=50); (ii) cáncer sin síntomas neurológicos: cáncer de mama (n=10), cáncer de ovario (n=10), cáncer cutáneo (n=10), cáncer de pulmón (n=4), tumores primarios de SNC (n=10), linfomas (n=5) y leucemias (n=5); (iii) Voluntarios sanos (n=50).

### **1.2.1. Criterios clínicos y electromiográficos de inclusión de pacientes con NMT y MG.**

Los criterios de inclusión de los pacientes con NMT se definieron como:

- Contracciones o calambres en al menos a dos regiones de músculos esqueléticos: craneales, extremidades superiores, tronco, extremidades inferiores.
- Estudios electromiográficos con descargas mioquímicas (40-150 Hz) o neuromiotónicas (150-300 Hz) en al menos a dos regiones de músculos esqueléticos [227]. Dos pacientes tenían síntomas adicionales de encefalitis límbica: déficits de memoria a corto plazo, crisis epilépticas temporales y un incremento de la señal T2 de la imagen por resonancia magnética en los hipocampos.

Los criterios de inclusión de los pacientes con MG se definieron como:

- Debilidad muscular, particularmente con afectación de músculos extraoculares o de otros grupos musculares.

- Estudios electrofisiológicos de estimulación nerviosa repetitiva o los estudios de electromiografía de fibra única con alteración primaria de la unión neuromuscular a nivel post-sináptico.
- Presencia de anticuerpos anti-AChR en el suero de los pacientes.

### **1.3. Muestras de tejido tímico para los estudios inmunohistoquímicos.**

Se utilizaron 20 timomas de pacientes (MG [n=17], MG y NMT [n=3]) y 25 tejidos tímicos normales de autopsias fetales o perinatales, incluidos en parafina y fijados con formalina. Para el estudio de la expresión de los antígenos *Caspr2*, *DCC* y *Netrin* *Uncoordinated-5-homolog A receptor* (*UNC5A*) se utilizaron tres timomas (pacientes 1, 2 y 8 de la **Tabla R9**) y siete tejidos tímicos normales de autopsias fetales o perinatales.

### **1.4. Tratamiento de las muestras.**

Los sueros se recogieron, almacenaron a -80°C y trataron de acuerdo con la legislación actual (18 de Noviembre, Real Decreto 1716/2011). Las muestras de tejido tímico se recogieron, fijaron con formalina e incluyeron en parafina utilizando el protocolo rutinario del servicio de Anatomía Patológica del “Hospital Universitario y Politécnico La Fe”. El estudio se aprobó por el comité ético del “Hospital Universitario y Politécnico La Fe”, Valencia (CEIB 2012/0145) y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes o sus familiares.

## **2. Cultivo y mantenimiento de la línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y).**

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (*CRL-2266, American Type Culture Collection, VA, US*) se propagó y mantuvo en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (*41965, Invitrogen, MA, US*) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (*26140, Invitrogen*), 10mL de L-glutamina (*25030,*

*Invitrogen*) y 5mg/mL de penicilina/ estreptomicina (15140, *Invitrogen*) en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células crecieron hasta alcanzar la confluencia (cuando las células cubrieron el 80-90% de la superficie del frasco) en un frasco para cultivo celular de 75cm<sup>2</sup> (156472, *ThermoFisher Scientific, MA, US*).

Para el subcultivo, las células se lavaron con 10 mL de DMEM precalentado a 37°C y se incubaron con 10 mL de Tripsina-0.05% ácido etilenediaminatetaacético (EDTA) (25300, *Invitrogen*) durante 2 min en el incubador a 37°C. Las células se recogieron en 10 mL de medio de cultivo completo y se centrifugaron a 300g durante 5 min.

Finalmente, el pellet se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo completo y se usó una relación de división de 1:4 para subcultivarlas.

Para almacenar las células a largo plazo, las células se contaron en un hematocitómetro y se centrifugaron como se ha descrito previamente. Se guardaron criotubos 5 x 10<sup>6</sup> células/mL de medio de congelación (20% suero fetal bovino con 10% dimetil sulfóxido [472301, *Sigma-Aldrich, OR, US*]) y se congelaron como indica el fabricante en un recipiente para congelación con isopropanol (5100, *ThermoFisher Scientific*).

### **3. Estudios de reactividad inmunitaria.**

#### **3.1 Inmunofluorescencia sobre células de neuroblastoma (SH-SY5Y).**

Para determinar la reactividad del suero de los pacientes con SOM frente a células de neuroblastoma humano (línea celular SH-SY5Y) se usaron los siguientes controles descritos previamente y anticuerpos frente a la proteína de citoesqueleto nestina (AB5922, *Millipore, CA, US*) para las incubaciones de células fijadas o anticuerpos frente al glicolípido de la superficie celular disialogangliósido GD2 (554272, *BD Biosciences, CA, US*) para las incubaciones *in vivo*.

En una placa de cultivo de 24 pocillos, se colocaron cubreobjetos redondos previamente autoclavados (631-0148, VWR, PA, US). Se añadieron 1mL/25cm<sup>2</sup> de 0.1mg/mL de poli-L-lisina (P8920, Sigma-Aldrich). Al cabo de 2h en el incubador a 37°C, los cubreobjetos se lavaron tres veces con H<sub>2</sub>O autoclavada y se dejaron secar antes de poner las células. Se sembraron 1x10<sup>5</sup> células/pocillo en medio de cultivo completo. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se inició el proceso de inmunofluorescencia *in vivo* o con las células fijadas:

- **Incubaciones *In vivo*:** Las células se incubaron con el suero de los pacientes o ratón anti-disialogangliósido GD2 (554272, BD Biosciences) (1:400 o 1:100 respectivamente, en medio de cultivo completo precalentado) durante 1h en el incubador a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7.2 (11666789001, Sigma-Aldrich) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% (19943, Affymetrix, CA, US) durante 15 min. Seguidamente, las células se bloquearon con PBS-triton X-100 al 0.2% y albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) al 1% durante 1h a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 y se incubaron con el secundario correspondiente: anti-IgG humana Alexa 488 (A11013, Molecular Probes, OR, US) o anti-IgG de ratón Alexa 488 (A11001, Molecular Probes) (1:1000 en tampón bloqueo PBS-BSA 1%). Se lavaron tres veces con H<sub>2</sub>O destilada y se incubaron con 5mg/μL de 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (D9542, Sigma-Aldrich) durante 10 min para contrateñir los núcleos. Finalmente, las células se lavaron con H<sub>2</sub>O y se montaron con 10μL de *ProLong Gold*/cubre (P36934, Invitrogen).

- **Incubación con células fijadas:** Las células se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente, se fijaron con PFA 4%, se permeabilizaron con PBS-Tx 0.1%-BSA 1% y se bloquearon al igual que se ha descrito anteriormente. Tras el bloqueo, las células se lavaron con PBS y se incubaron con los sueros o conejo anti-*nestina* (*AB5922, Millipore*) (1:400 o 1:200 respectivamente, en tampón bloqueo PBS-BSA1%) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron e incubaron con los secundarios correspondientes anti-IgG humana o anti-IgG de conejo Alexa 555 (*A21428, Invitrogen*) (1:1000 en PBS-BSA1%), se contratiñeron y montaron, como se ha descrito previamente. Los resultados se fotografiaron en el microscopio de fluorescencia (*Eclipse 80i, Nikon*) usando el software NIS-elements. Como controles positivos, en paralelo también se incubaron el suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con anticuerpos anti-NMDAR y AMPAR (1:200 o 1:2 respectivamente, en PBS-BSA1%) sobre secciones sagitales de 7µm de cerebro/cerebelo de rata Wistar fijada 1h por inmersión con PFA 4%, tal y como se describe a continuación.

### **3.2 Inmunofluorescencia sobre secciones sagitales de cerebro y cerebelo de rata.**

Se sacrificó con CO<sub>2</sub> una rata macho Wistar por experimento (dos meses de edad, *Charles River Laboratories, FR*). Se extrajo el cerebro y cerebelo en una placa con PBS pH 7.4 y se separaron los hemisferios con una cuchilla desechable. Posteriormente, cada trozo se fijó por separado en 25 mL de PFA 4% (*Affymetrix*) durante 1h. Después, se secó en papel de filtro para eliminar excesos del fijador y se sumergió en 25mL de una solución de sacarosa al 30% en PBS pH 7.4 durante 48h. Tras el proceso de crioprotección, el cerebro se colocó en unos moldes con *Optimum Cutting Temperature* (*Sakura Finetek, US*) y se congeló durante 1 min en N<sub>2</sub> líquido. Se cortaron secciones

de 7  $\mu\text{m}$  utilizando un criostato (*CM1850 Leica, DK*) y portaobjetos *Superfrost (49514, ThermoFisher Scientific)* y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para realizar la inmunofluorescencia, se dejó descongelar el tejido a temperatura ambiente durante 20 min. Se hidrató con PBS 5 min, se permabilizó con Triton-X100 al 0.3% en PBS durante 5 min, se bloqueó con PBS-BSA al 1% durante 2h a temperatura ambiente y se incubó toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con el suero o líquido cefalorraquídeo en el mismo tampón bloqueo (1:200 o 1:2 respectivamente). Al día siguiente, se lavó tres veces con PBS durante 10 min, se incubó con el secundario correspondiente: anti-IgG o IgM humana Alexa 488 (*Molecular Probes*) (1:1000 en tampón bloqueo) durante 1h en oscuridad. Se lavó tres veces durante 10 min con PBS, se incubó con  $5\text{mg}/\mu\text{L}$  de DAPI (*Sigma-Aldrich*) durante 10 min para contrateñir los núcleos y se montaron con *ProLong Gold (Invitrogen)*. En todos los ensayos se incluyó un control de un individuo sano y controles positivos pacientes con anticuerpos (IgM anti-MAG o IgG anti-Hu, anti-NMDAR, anti-AMPA). Los resultados se fotografiaron en el microscopio de fluorescencia (*Eclipse 80i, Nikon*) usando el software NIS-elements.

### **3.3 Inmunofluorescencia sobre uniones neuromusculares de ratón cepa C57BL/6J.**

Se sacrificaron ratones machos de la cepa C57BL/6J (un mes edad, *Charles River Laboratories*) con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico ( $120\text{mg}/\text{Kg}$  *Eutanax, Fatro, ES*). El músculo del diafragma se extrajo y se lavó durante 30 min. Bajo la lupa, se eliminó el tejido conectivo y se bloqueó el tejido con BSA 1% Tritón X100 al 0.2% en PBS durante 2h. Se incubó con el suero (1:100 en PBS-BSA1%) en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron seis lavados con PBS de 10 min cada uno. Se incubó con el secundario anti-IgG o IgM humana Alexa 488 (*Molecular Probes*) y se lavó durante 30 min. Las uniones musculares se tiñeron con  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada con tetrametilrodamina (*T1175,*

*Invitrogen*) (1:5000 en PBS pH7.4) durante 10 min. El tejido se lavó con H<sub>2</sub>O durante 30 min y se montó con *ProLong Gold (Invitrogen)*. Los resultados se fotografiaron en el microscopio confocal con el software *FV Viewer (FV1000, Olympus, JP)* de la Unidad de Microscopía de la Universidad de Valencia.

### **3.4 Inmuno oro post-embedding con sueros de pacientes sobre células de neuroblastoma (SH-SY5Y).**

Se sembraron  $8 \times 10^4$  células SH-SY5Y/pocillo en *chamber slides* de Permax de ocho pocillos (177445, *ThermoFisher Scientific*). Tras crecer durante 24h, las células se lavaron tres veces con *phosphate buffer (PB)* 0.1M y se fijaron con PFA 4% y 0.1% glutaraldehído (16210, *Electron Microscopy Sciences, PA, US*) en PB 0.1M durante 1h a 4°C. Tras lavar las células tres veces con PB 0.1M, las células se incubaron con 1% de borohidruro sódico (213462, *Sigma-Aldrich*) en PB 0.1M y luego se lavaron con PB cada 10 min durante 1h. Las células se incubaron con una “solución bloqueo A”: 0.5% BSA acetilada (25557, *Electron Microscopy Sciences*) en PB 0.1M durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con suero humano de individuos sanos o de pacientes con SOM (1:100 en la “solución de bloqueo A”) durante 96h en agitación a 4°C. Las células se lavaron tres veces con PB 0.1M y se bloquearon con la “solución de bloqueo B”: 0.5% BSAC y 0.1% gelatina de pez (25560, *Electron Microscopy Sciences*) en PB 0.1M. Seguidamente, se incubaron con cabra anti-IgG humana conjugada con oro coloidal de 10nm (1:50 en la “solución de bloqueo B”) (25209 *Electron Microscopy Sciences*) durante 24h en agitación a 4°C. Las células se contrastaron con 1% tetróxido de osmio (75632, *Sigma-Aldrich*) y 7% glucosa durante 30 min y se deshidrataron en una serie de etanol en concentraciones crecientes: 5 min en etanol 30°, 5 min en etanol 50° y 5 min en etanol 70° dos veces. Se lavaron en acetato de uranilo al 2% en alcohol de 70° 2h a 4°C y se deshidrataron 5 min con etanol 70°, 96°, 100° y 100° seco durante 10 min. Finalmente, las células se cubrieron durante 5 min con

óxido de propileno impidiendo que no se secase la muestra. Sin eliminar por completo el óxido de propileno, se añadió la resina *Durcupan ACM (44650, Sigma-Aldrich)*. A los 20 min, se retiró la resina de los portaobjetos y se añadió nueva, se dejó toda la noche y al día siguiente se volvió a cambiar. Los portaobjetos cubiertos con la resina se dejaron polimerizar durante tres días en la estufa a 70°C. Se cortó una zona donde estuviesen las células con una cuchilla y se obtuvieron secciones semifinas (1.5 µm) con un ultramicrotomo (*Ultracut UC-6, Leica*), se tiñeron con azul de toluidina al 1%. Las secciones semifinas se seleccionaron en el microscopio de campo claro, en base a la marca de inmunotinción. Se cortaron secciones ultrafinas (60-70nm) que se tiñeron con citrato de plomo (solución de Reynold). Las fotomicrografías se obtuvieron usando la cámara digital AMT del microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 (*JEOL, JP*), en la Unidad de Microscopía de la Universidad de Valencia.

#### **4. Purificación de sinaptosomas de rata.**

Los sinaptosomas se aislaron siguiendo el protocolo de gradiente discontinuo de Percoll descrito por Dunkley *et al* [297], con las mínimas modificaciones posibles. Se sacrificó con CO<sub>2</sub> una rata macho Wistar (dos meses de edad, *Charles River Laboratories*) para cada experimento. El cerebro, cerebelo y tronco cerebral se separó rápidamente y se diseccionó en una placa Petri sobre hielo. El tejido se homogeneizó con un Potter-Elvehjem con 20 pases a 600 r.p.m en tampón isotónico de sacarosa/EDTA (0.32 M sacarosa, 1mM EDTA, 5mM Tris pH 7.4 con inhibidores de proteasas [*P8340, Sigma*]) a 4°C. El homogeneizado se centrifugó a 1,000g durante 10 min a 4°C en un rotor de ángulo fijo de 34° (*SS34, Sorvall, CA, US*) para eliminar restos celulares que no se hubiesen roto. Para algunos experimentos, el sobrenadante (S1, homogeneizado total) se centrifugó a 15,000g durante 30 min a 4°C, y el pellet (P2) contenía la fracción de sinaptosomas crudos. Para otros experimentos, se creó un gradiente de Percoll filtrado

(17-0891-01, *GE Healthcare, UK*) con una bomba peristáltica *Minipuls* (*Gilson, WI, US*) con un flujo de 0.02 cm<sup>3</sup>/s. Esta bomba permitió que se crearan capas sucesivas, de 23, 15, 10, 3% de Percoll, sin que se mezclasen entre ellas. El sobrenadante S1 se aplicó encima del gradiente y se centrifugó a 31,000g durante 5 min a 4°C sin freno. La interfase entre las capas 15 y 23%, que contenía la fracción de sinaptosomas purificados, se recogió con una pipeta Pasteur. Finalmente, la fracción sinaptosomal se lavó con sacarosa/EDTA y se centrifugó a 20,000g durante 30 min a 4°C para eliminar los restos de Percoll.

Para validar el aislamiento de sinaptosomas se separaron 200µl de cada fracción para realizar un análisis semicuantitativo de Western-blot y visualizar las fracciones por microscopía electrónica.

#### **4.1 Western-blot de las fracciones del proceso de purificación de sinaptosomas.**

La cantidad de proteína total en las fracciones de homogeneizado total y fracciones sinaptosomales se cuantificó usando el método Bradford (5000006, *Bio-Rad, CA, US*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas se resuspendieron en tampón de carga y se calentaron a 95°C durante 5 min. Se separaron 20 µg/calle y 10µL de la escalera de peso molecular (*LC5800, Invitrogen*) en un gel de poliacrilamida al 4-12% (*NP032, Invitrogen*) a 200V durante 35 min. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45µm (*LC2001, Invitrogen*), y se incubaron con la “solución de bloqueo I”: 5% leche semidesnatada (*70166, Sigma-Aldrich*) y 0.1% Tween-20 (*P9416, Sigma-Aldrich*) en PBS pH 7.2 durante 1h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-*post-synaptic density 95* (PSD95) (*MAB1596, Millipore*), conejo anti-NMDAR (*Ab9864, Abcam, UK*), ratón anti-sinaptofisina (*Ab8049, Abcam*), ratón

anti-HuD (*sc-48421*, *Santa Cruz Biotechnologies, TX, US*) (1:100 en “solución bloqueo I”) durante toda la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron con PBS/Tween-20 0.1%, y se incubaron con anti-IgG de ratón o conejo conjugados con la peroxidasa de rábano picante (*7076 y 7074, Cell Signaling, MA, US*) (1/20,000 en “solución bloqueo I”) durante 1h a temperatura ambiente. Para la inmunodetección, se utilizó un kit de detección de quimioluminiscencia ProtoGlow ECL (*CL-300, National Diagnostics, GA, US*). Las bandas de proteínas se visualizaron utilizando el equipo *Luminescent image analyzer LAS-1000 plus* (*Fujifilm, JP*) con el software de imagen *Image Reader LAS-1000*. Como control de carga, las membranas se incubaron 10 min con stripping buffer (*21059, Thermo Fisher Scientific*), se bloqueó con la “solución de bloqueo I” durante 1h, y se incubó con el anticuerpo primario de ratón anti-*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GADPH) (*MAB347, Millipore*) (1/5,000 en “solución bloqueo I”) durante 1h a temperatura ambiente. Después, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente y se reveló en las mismas condiciones descritas anteriormente.

#### **4.2 Microscopía electrónica de las fracciones de sinaptosomas.**

Se recogieron 100µL de cada fracción obtenida en el gradiente discontinuo de Percoll: fracción de mielina y membranas, fracción de sinaptosomas y membranas y fracción de sinaptosomas y mitocondrias. Las fracciones se centrifugaron a 20,000g durante 10 min a 4°C. Cada pellet se fijó con 2.5% glutaraldehído en PB 0.1M durante 1h min a 37°C. Tras lavar el pellet tres veces con PB 0.1M, cada muestra se calentó en un baño a 54°C y después de 15 s las fracciones se embebieron en agar (1:1) al 2% en PB 0.1M. Los fragmentos de agar se dejaron enfriar. Una vez solidificados se cortaron en trozos pequeños, se incluyeron para microscopía electrónica. Basicamente, se contrastaron con 1% tetróxido de osmio 30 min y se procesaron para microscopía electrónica, como se ha descrito previamente con la diferencia de que cada fragmento de agar se colocó en un

molde para polimerizar la resina epoxi. Posteriormente, el bloque polimerizado con la muestra se cortó con una cuchilla y se obtuvieron secciones semifinas (1.5 µm) con un ultramicrotomo (*Ultracut UC-6, Leica, DK*). Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se seleccionaron en el microscopio de campo claro si contenían muestra biológica. A partir de estas secciones semifinas se cortaron secciones ultrafinas (60-70nm) que se tiñeron con citrato de plomo (solución de Reynold). Las fotomicrografías se obtuvieron usando la cámara digital AMT del microscopio electrónico de transmisión JEM 1010 (*JEOL, JP*) del Servicio de Microscopía de la Universidad de Valencia.

## 5. Experimentos de inmunoprecipitación.

Se realizaron un total de 50 experimentos de inmunoprecipitación, incluyendo los sueros de los pacientes seleccionados y casos control en paralelo, con tres sustratos diferentes: cerebro de rata, sinaptosomas de rata (fracción de sinaptosomas crudos o de sinaptosomas purificados) y línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). El esquema de las inmunoprecipitaciones realizadas puede verse en la **Tabla M1**.

**Tabla M1.** Experimentos de inmunoprecipitación realizados.

Enfermedad	Sustrato				
	Cerebro de rata	Sinaptosomas crudos (IgG)	Sinaptosomas crudos (IgM)	Sinaptosomas purificados	Neuroblastoma (SH-SY5Y)
Encefalitis IgLON5	√	√	√	-	-
Individuos sanos	√	√	√	√	-
NMT aislada	-	√	-	√	√
NMT+MG+timoma	-	√	-	√	-
NMT+MGUS	-	√	√	√	-
SOM idiopático	-	√	√	√	-
SOM+ Neuroblastoma	-	√	√	√	√

√ Experimentos realizados, - Experimentos no realizados.

## 5.1 Inmunoprecipitación con tejido nervioso.

Se sacrificó con CO<sub>2</sub> una rata macho Wistar por cada experimento de inmunoprecipitación (dos meses de edad, *Charles River Laboratories*). Se extrajo el cerebro y cerebelo y se pesó en seco. Posteriormente, para eliminar restos de sangre, el tejido se lavó con PBS filtrado en una placa sobre hielo. Se preparó el tampón de lisis desnaturizante añadiendo en fresco inhibidores de proteasas y fosfatasa 1:100 (*P8349, P5726 y P0044 respectivamente; Sigma-Aldrich*) al tampón de lisis: 150mM NaCl, 1mM EDTA, 100mM tris-HCl, 1% tritonX-100, 1% desoxicolato sódico pH 7.5. Se diseccionó el tejido y se añadió el tampón de lisis con los inhibidores (1:10), se homogeneizó en hielo usando un Potter-Elvehjem con 20 pases a 600 r.p.m. Para favorecer la lisis, el extracto se mantuvo con el tampón de lisis y los inhibidores 1h en rotación a 4°C. Después, para eliminar los restos sin lisar, el homogeneizado se centrifugó a 1,000g 10 min a 4°C. El homogeneizado se incubó con 10µL del suero de pacientes o controles durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 140µL de microesferas de agarosa acopladas con proteína A/G (*20423; Pierce, IL, US*) tres veces con PBS durante 5 min y se centrifugaron a 1,000g 5 min a 4°C. Entre los lavados se centrifugó el homogeneizado a 21,300g 30 min a 4°C. El sobrenadante se incubó con las microesferas de agarosa y proteína A/G durante 4h.

## 5.2 Inmunoprecipitación con la línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y).

Las células SH-SY5Y crecieron hasta la confluencia y se incubaron con el suero de pacientes o controles (1:100 en medio de cultivo completo precalentado), durante 1h en el incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para eliminar los anticuerpos que no se habían unido a las células, se lavaron tres veces con PBS pH 7.2. Con un *cell-scrapper* se recogió la monocapa de células del frasco sobre hielo en 1mL de tampón de lisis desnaturizante

(descrito previamente) enfriado a 4°C. Para favorecer el lisado, las células se mantuvieron en el tampón de lisis durante 1h a 4°C en agitación. Los lisados se centrifugaron a 21,300g durante 30 min a 4°C, y el sobrenadante se añadió sobre las microesferas de agarosa acopladas con proteína A/G que se incubaron durante toda la noche a 4°C.

### **5.3 Inmunoprecipitación con sinaptosomas.**

Las fracciones de sinaptosomas crudos o purificados se incubaron durante toda la noche a 4°C con el suero de pacientes o controles, diluidos a 1:100 en tampón isotónico de sacarosa/EDTA (0.32 M sacarosa, 1mM EDTA, 5mM tris pH 7.4 con inhibidores de proteasas [*P8340*; *Sigma-Aldrich*]). Tras la incubación, las muestras se lavaron tres veces con el tampón isotónico de sacarosa/EDTA, y se trataron con tampón de lisis, como se ha descrito anteriormente. Los sinaptosomas lisados se centrifugaron a 21,300g durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se añadió sobre las microesferas de agarosa acopladas con proteína A/G (*20423*; *Pierce*) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Para los experimentos de inmunoprecipitación de IgM: 150µL de las microesferas con proteína A/G se lavaron e incubaron previamente con un anticuerpo monoclonal anti-IgM humana (*I6385*, *Sigma-Aldrich*) diluído a 1:500 en PBS toda la noche.

## **6. Electroforesis desnaturizante de las proteínas inmunoprecipitadas.**

Las microesferas de agarosa acopladas a proteína A/G con los anticuerpos unidos, se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en tampón de carga preparado con: 20µl de *Loading sample buffer* 4x, 5µl *NuPAGE reducing agent* 10x (*NP0007* y *NP0009*, *Invitrogen*) y 5µl H<sub>2</sub>Od. Cada muestra se calentó durante 5 min a 95°C, las microesferas se centrifugaron a 1,000g 5 min. Se cargaron 25µl de muestra/pocillo y 10µL de la escalera de peso molecular (*LC5800*, *Invitrogen*) en un gel de poliacrilamida

discontinuo al 4-12% (*NP032, Invitrogen*). La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes con el tampón ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico (MOPS) (*NP0001, Invitrogen*) a 200V durante 35 o 50 min (dependiendo de si corrían a la vez uno o dos geles respectivamente). Estas condiciones permitieron un rango de separación de 15-260 KDa. Los geles se lavaron tres veces con H<sub>2</sub>O y se fijaron las proteínas con una mezcla 50% metanol/10% acético durante 15 min en agitación. Para eliminar los restos de fijador, los geles se lavaron tres veces con H<sub>2</sub>O y se tiñeron durante 2h con azul de Coomassie (*G1041; Sigma-Aldrich*) para visualizar las proteínas.

## **7. Análisis por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) y búsqueda en bases de datos**

El análisis proteómico de las muestras de las inmunoprecipitaciones se realizó en la Unidad de Proteómica de la Universidad de Valencia.

**Preparación de la muestra:** Las calles de los geles se cortaron y se separaron las bandas de las cadenas pesadas y ligeras de las IgGs. Las proteínas se digirieron utilizando tripsina apta para secuenciación (*Promega, WI, US*) siguiendo un protocolo ampliamente establecido [298]. La mezcla de péptidos de la digestión se secó en una centrifuga de vacío y se resuspendió en 10µL de acetonitrilo (ACN) al 2% y ácido trifluoro acético (TFA) al 0.1%.

**Cromatografía líquida:** La mezcla de péptidos tripsinizados se separó por cromatografía líquida (*High performance liquid chromatography, nanoHPLC*). Para ello, se cargaron 5µL de la muestra en un sistema nanoLC en una columna 3µ C18-CL de 75µm x 15cm (*Eksigent, CA, US*). La muestra se desaló con 0.1% TFA con un flujo de 2µL/min durante 10 min en cada inyección. Posteriormente, la muestra se transfirió a una columna analítica 3µ ChromXP C18-CL de 75µm x 12cm (*Nikkyo Technos, JP*) equilibrada con 5% ACN y 0.1% de ácido fórmico (FA). Los péptidos se eluyeron

usando un gradiente lineal formado por A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA desde 5 a 40% B en 45 min con un flujo de 300 nl/min.

**Espectrometría de masas:** Para el análisis de espectrometría de masas se utilizó un sistema nanoESI qTOF (*5600 TripleTOF, ABSCIEX, MA, US*) con el espectrómetro de masas en modo dependiente de datos. Los péptidos se ionizaron aplicando 2.8kV al spray emisor. El escaneo de inspección MS1 adquirió desde 350-1250 m/z durante 250 ms. Para los experimentos MS2 se situó la resolución cuádruple en “UNIT”, la cual permitía adquirir datos de 100-15000m/z durante 50ms en el modo “*high sensitivity*”. Se utilizaron los siguientes criterios: carga 2<sup>+</sup> a 5<sup>+</sup>; intensidad mínima; 70 conteos por segundo (cps). Se seleccionaron hasta 50 iones por fragmentación después de cada escaneo. La exclusión dinámica era de 15s.

**Procesamiento de datos:** Para la identificación de las proteínas se utilizaron las bases de datos del *National centre for biotechnology information* (NCBI) con el software de búsqueda Mascot v2.3.02 (*Matrixscience, UK*) y ProteinPilot v4.5 (*ABSCIEX*) que utilizaron los archivos de picos en formato mgf generados con el ProteinPilot desde los archivos wiff del instrumento. Los parámetros de búsqueda Mascot utilizados incluían: péptidos tripsinizados con hasta un sitio de corte perdido (missed cleavages), una tolerancia de masa 50 ppm en el modo MS y 0.6 Da en el modo MS/MS; como modificaciones fijas: carbamidometilación de cisteína, oxidación de metioninas y deamidación de asparaginas y glutaminas; y como modificaciones variables: sin restricción de taxonomía. Los parámetros de búsqueda del ProteinPilot incluían: especificidad para tripsina, carbamidometilación de cisteína, no restricción de taxonomía y un esfuerzo de búsqueda en modo Thorough ID, ya que pese a una velocidad de búsqueda (s/espectro) más lenta permitía una búsqueda más extensa. El valor de Unused es una medida de la confianza para la detección de una proteína calculada a partir de la confianza de los péptidos que no han sido completamente usados

por proteínas con un ranking mayor. De modo que el software asegura que no se utilizan los mismos datos múltiples veces para justificar la detección de múltiples proteínas. El punto de corte utilizado fue Unused >1.3 para una confianza en la identificación >95%, tal y como se indica en la información del software ProteinPilot <http://sciex.com/Documents/tech%20notes/ProteinPilot-Software-Overview-RUO-MKT-02-1777-A.pdf>.

## **8. Análisis diferencial y funcional de las proteínas inmunoprecipitadas.**

La abundancia de las proteínas se estimó utilizando un método basado en la intensidad de la señal de los péptidos que se basaba en la relación entre la señal de MS. Se ha observado que la media de la señal de los tres péptidos más intensos es proporcional a la abundancia de las proteínas [299]. Por esta razón, la señal de los tres péptidos más intensos con confianza > 95% del archivo generado por ProteinPilot se utilizó como una medida de la abundancia de las proteínas en cada muestra.

Dada la gran variabilidad en el número de proteínas identificadas en cada muestra, debido al tipo de sustrato utilizado para la inmunoprecipitación, finalmente los datos cuantitativos se utilizaron para comparar las proteínas inmunoprecipitadas por paciente con todos los controles. Solamente se consideraron para el análisis las proteínas identificadas exclusivamente por los casos y no en los controles. Todas las proteínas identificadas con los sueros control no se consideraron para el análisis siguiente. Se utilizaron las bases de datos *Universal protein resource* (UniProt, disponible en [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) y *Online mendelian inheritance in men database* (OMIM, disponible en [www.omim.org](http://www.omim.org)) para evaluar la localización subcelular de las proteínas y analizar su función respectivamente. Para evaluar los fenotipos de los ratones mutantes, se utilizó la base de datos *Mouse genome database* (MGD, disponible en [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)).

## 9. Estudios de ensayos con células.

Para testar la presencia de autoanticuerpos en los pacientes estudiados se utilizaron células HEK 293T que se transfectaron con plásmidos para expresar las proteínas humanas candidatas de las inmunoprecipitaciones. Para realizar estos experimentos, a continuación se describe: la purificación y subclonación del DNA plasmídico, la transfección de las células por lipofección, y las inmunofluorescencias indirectas exponiendo los sueros de los pacientes a las células transfectadas con los candidatos antigénicos.

### 9.1 Obtención y purificación de DNA plasmídico.

Se resuspendieron 10µg DNA plasmídico liofilizado o 5µg de DNA enviado en papel Whatmann en 50µL o 100µL H<sub>2</sub>O ultrapura respectivamente (Véase la **Tabla M2**).

**Tabla M2.** Listado de plásmidos utilizados.

ORF del plásmido	Fuente	Referencia NCBI	Etiqueta
<i>Human potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 1 (KCNC1)</i>	Origene, RG215716	<a href="#">NM_004976.2</a>	GFP-C terminal
<i>Human potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 2 (KCNC2)</i>	Origene, RG220410	<a href="#">NM_139136.2</a>	GFP-C terminal
<i>Human potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 3 (KCNC3)</i>	Origene, RG222238	<a href="#">NM_004977.2</a>	GFP-C terminal
<i>Human potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 4 (KCNC4)</i>	Origene, RG211017	<a href="#">NM_153763.2</a>	GFP-C terminal
<i>Human potassium channel tetramerisation domain containing 7 (KCTD7)</i>	Origene, RG221998	<a href="#">NM_153033</a>	GFP-C terminal
<i>Human contactin-associated protein-like 2 (CASPR2)</i>	Origene, SC115167	<a href="#">NM_014141.3</a>	No
<i>Human deleted in colorectal carcinoma (DCC)</i>	pCAGGS: DCC [263]	<a href="#">XM_017025569</a>	No
<i>Human uncoordinated-5 homolog A (UNC5A)</i>	Origene, RG212389	<a href="#">NM_133369.2</a>	GFP-C terminal
<i>Human glutamate receptor, metabotropic 3 (GRM3)</i>	Origene, RG207379	<a href="#">NM_000840.2</a>	GFP-C terminal
<i>Human Neurexin-1 (NRXN1)</i>	Origene, RG215381	<a href="#">NM_138735.1</a>	GFP-C terminal

\*Abreviaturas utilizadas: GFP, proteína verde fluorescente (del inglés *green fluorescent protein*); NCBI, *National center for biotechnology information*; ORF, marco abierto de lectura (del inglés *open reading frame*).

La cepa DH5 $\alpha$  quimiocompetentes de *Escherichia coli* (40 $\mu$ L, 18265, *Invitrogen*) se incubó con 2 $\mu$ L de DNA plasmídico/transformación (o 10  $\mu$ L de DNA en el caso del DNA obtenido del papel) durante 15 min en hielo. Se realizó un choque térmico calentando las bacterias con el DNA durante 45s en un baño de agua a 42°C. A continuación, las bacterias se enfriaron durante 2 min en hielo. Se añadió 200 $\mu$ L de medio SOC (15544, *Invitrogen*) precalentado. Las bacterias se incubaron a 37°C durante 1h a 225 r.p.m y se sembraron 50 $\mu$ L de cada transformación en placas con medio Luria Broth (LB) selectivo (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl pH 7.4 autoclavado y suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL o kanamicina 50  $\mu$ g/mL, según la resistencia de cada plásmido). Las bacterias se incubaron a 37°C durante toda la noche. Para la clonación se seleccionó una colonia de bacterias resistente y se realizó un precultivo en 4mL de medio LB líquido con el antibiótico de selección en agitación durante 8h a 37°C. Posteriormente se diluyó el cultivo a 1/100 en 125mL de medio LB selectivo y se dejó en agitación toda la noche a 37°C. Se almacenó un *stock* del cultivo en glicerol al 20% a -80°C.

A partir del resto del cultivo, el DNA plasmídico se purificó utilizando un kit de extracción y purificación de DNA MaxiPrep (50912162, *Qiagen, CA, US*). El cultivo de bacterias transformadas se centrifugó a 6,000 g durante 15 min a 4°C y sobre el pellet se añadieron 10 mL del tampón de resuspensión (50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA y 100 $\mu$ g/mL RNAsa A). A continuación, el pellet con las bacterias se lisó con 10mL del tampón de lisis (NaOH 200mM, dodecilsulfato sódico [SDS] 1%) durante 5 min a temperatura ambiente. La reacción se neutralizó con 10mL del tampón de neutralización (acetato potásico 1M a pH5.5) durante 20 min a 4°C. Tras ajustar el pH de la columna de intercambio iónico, se equilibró con un tampón de equilibrio (NaCl 750mM, 50mM MOPS a pH 7, 15% de isopropanol y 0.15% Triton X-100), se añadió el lisado de las bacterias transformadas. Finalmente, la columna se lavó con 60 mL de tampón de

lavado (NaCl 1M, 50mM MOPS pH7 y 15% isopropanol) y el DNA se eluyó en 15 mL de tampón de elución (NaCl 1.6M, 50mM MOPS pH7 y 15% isopropanol). El DNA plasmídico se desaló con 10.5mL de isopropanol (I9156, Sigma Labs) y se retuvo con el filtro *qiaprecipitator maxi module* del kit. El DNA plasmídico purificado se lavó con 2 mL de etanol de 70° y se resuspendió en 0.5mL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH8, 1mM EDTA).

Finalmente, se cuantificó el DNA plasmídico en 1µL de muestra utilizando un nanodrop (*ND2000, ThermoFisher Scientific*), empleando como blanco 1µL del tampón TE utilizado para resuspender el DNA.

## **9.2 Corte con enzimas de restricción y ligación del DNA plasmídico.**

La secuencia de DNA codificante que contenían los plásmidos: *Human potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 1 (KCNC1)* y *Human potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 3 (KCNC3)* se cortó con enzimas de restricción para eliminar la etiqueta de la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*) de las proteínas.

**Digestión del plásmido vacío y defosforilación:** El plásmido vacío pCMV6-AC (10µg) (*PS100020, Origene*) se cortó con 20 unidades del enzima de restricción AsiSi (*R0630S, New England Biolabs, MA, US*) en el tampón NEB 3.1 (*New England Biolabs*) para un volumen final de 120µL durante 2h a 37°C. Posteriormente, la reacción se inactivó por calor a 80°C durante 20 min. Para la segunda digestión se añadieron 20 unidades del enzima MluI (*R0198S, New England Biolabs*) y se repitió la incubación e inactivación. El vector se defosforiló usando el Kit *Rapid DNA Dephos & Ligation* (*04898117001, Roche, CH*) con 10µL de la mezcla anterior. El vector se incubó con una unidad de fosfatasa alcalina en el tampón de la fosfatasa alcalina para un volumen final

de 20  $\mu\text{L}$  durante 10 min a 37°C. Y se inactivó a 75°C durante 2 min. Al mismo tiempo, se realizó la doble digestión de los plásmidos que contienen las secuencias de los genes *KCNC1* y *KCNC3* (10 $\mu\text{g}$  cada uno) con 20 unidades de AsiSI y 20 unidades de MluI en el tampón NEB3.1 en un volumen final de 120 $\mu\text{L}$  durante 2h a 37°C.

**Electroforesis de DNA:** Se preparó un gel de agarosa 0.8% (8045, *Condalab, ES*) en tampón Tris Borato EDTA 0.5X (T7527, *Sigma Labs*) suplementado con 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromuro de etidio (161-0433, *Bio-Rad, CA, US*). Para comprobar el proceso de digestión, se cargó la mezcla completa de la doble digestión y 1 $\mu\text{L}$  de la mezcla que contenía el plásmido vacío digerido. Se separaron a 85V durante 20 min y luego a 90V en una cubeta de electroforesis de DNA (75.710, *Bio-Rad*).

**Recuperación del DNA del gel de agarosa:** Para recuperar el DNA de los insertos del gel de agarosa se utilizó un kit de extracción (42-0050, *Genomed, MO, US*). Las bandas de los insertos se recortaron. A continuación, las bandas de agarosa se pesaron y se añadió el tampón de solubilización en proporción 1:3. La banda con el inserto se calentó durante 15 min en un baño a 50°C. Tras centrifugar la solución a 12,000g durante 1 min, el DNA se purificó con una columna de purificación que retuvo el DNA. Finalmente, el DNA se lavó con el tampón de lavado, se eluyó en 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O ultrapura y se cuantificó la concentración final en el nanodrop (*ThermoFisher Scientific*).

**Ligación del inserto con el vector vacío digerido y defosforilado:** El vector y el inserto (50 y 100 ng respectivamente en 10 $\mu\text{L}$  de tampón de dilución) se incubaron con 5 unidades de T4 DNA ligasa en tampón T4 DNA ligasa (10 $\mu\text{L}$  de volumen final) durante 5 min a temperatura ambiente. La ligación se comprobó con un gel de DNA de agarosa. Para clonar los nuevos plásmidos las bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  se transformaron con 2 $\mu\text{L}$  de la mezcla de ligación, tal y como se ha descrito anteriormente.

### 9.3 Ensayo por inmunofluorescencia con células de riñón embrionarias humanas (HEK293T) transfectadas.

Las células HEK293T (*CRL-3216, American Type Culture Collection*) se mantuvieron a en un medio DMEM (*41965047, Invitrogen*) suplementado con 5% suero de caballo y 5% suero fetal bovino inactivados por calor (*16050, 26140, Invitrogen*), 10% L-glutamina 200 mM y 10% penicilina/estreptomicina en un incubador a 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Las células se cultivaron sobre una placa de 60 mm (*Z707678, Sigma-Aldrich*) con cubreobjetos autoclavados y pretatados con poli-D lisina 5ng/μL (*P0899, Sigma-Aldrich*). Cuando las células alcanzaron un 80-90% de confluencia, se transfectaron con Lipofectamina 2000 (*11668, Invitrogen*) con una mezcla de DNA plasmídico y lipofectamina/placa en Optimem (Invitrogen) de acuerdo con la **Tabla M3**.

**Tabla M3.** *Condiciones para la transfección con Lipofectamina para una placa p60.*

Plásmido	DNA en 500μL de Optimem	Lipofectamina en 500μL Optimem
<i>KCNC1, KCNC2, KCNC3, KCNC4</i>	Subunidades aisladas: 10μg DNA. Cotransfecciones: 5μg DNA+5μg DNA <i>KCNC3</i>	10μL
Resto de plásmidos	8μg DNA	10μL

Tras 20 min de la incubación con la mezcla de transfección, se añadió nuevo medio de cultivo completo. A las 24h de la transfección se realizaron inmunofluorescencias con células vivas o fijadas, como se indica a continuación:

**Células vivas:** Las células se incubaron con el suero 1:40 o anticuerpos comerciales en PBS-BSA 1% (Véase la **Tabla M4**) durante 1h a 37°C. Se lavaron tres veces con PBS pH7.4, se fijaron con PFA 4% durante 10 min, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.3% en PBS durante 5 min, se lavaron de nuevo y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-IgG a 1/1000 correspondientes (*A11014, A11058, A11005 o A11008, Molecular Probes*).

**Tabla M4.** Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas en células HEK293T.

Anticuerpo	Fuente	Dilución
Cabra anti- <i>potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 1 (KCNC1)</i>	sc-23319, Santa Cruz Biotechnologies	1:100
Ratón anti- <i>potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 2 (KCNC2)</i>	sc-514099, Santa Cruz Biotechnologies	1:100
Conejo anti- <i>potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 3 (KCNC3)</i>	APC-102, Alomone Labs	1:100
Ratón anti- <i>potassium voltage-gated channel Shaw-related subfamily, member 4 (KCNC4)</i>	Ab93605, Abcam	1:100
Ratón anti- <i>potassium channel tetramerisation domain containing 7 (KCTD7)</i>	Ab168557, Abcam	1:100
Conejo anti- <i>contactin-associated protein-like 2 (CASPR2)</i>	Ab33994, Abcam	1:5000
Conejo anti- <i>deleted in colorectal carcinoma (DCC)</i>	Sc-11437, Santa Cruz Biotechnologies	1:100
Cabra anti- <i>unc oordinated 5 homolog A (UNC5A)</i>	Sc-67903, Santa Cruz Biotechnologies	1:100
Ratón anti- <i>glutamate receptor, metabotropic 3 (GRM3)</i>	Sc-271899, Santa Cruz Biotechnologies	1:100
Cabra anti- <i>neurexin-1 (NRXN1)</i>	Ab77596, Abcam	1:100

**Células fijadas:** Las células transfectadas con el resto de plásmidos se fijaron y trataron como se ha descrito anteriormente y se incubaron con el suero de los pacientes a 1:40 o anticuerpos comerciales en PBS-BSA 1% (Véase la **Tabla M4**) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron y se incubaron con los secundarios correspondientes en las condiciones descritas previamente.

Los resultados se fotografiaron en el microscopio de fluorescencia (Eclipse 80i, Nikon) usando el software NIS-elements.

## 10. Estudios inmunohistoquímicos sobre tejido tímico.

Las secciones de tejido tímico (de 4 µm) se trataron durante 20 min con calor en tampón citrato pH6 (*Dako, Glostrup, DK*) y se incubaron con los anticuerpos primarios (Véase la **Tabla M5**).

**Tabla M5.** Anticuerpos utilizados para el estudio inmunohistoquímico de tejido tímico.

Anticuerpo contra	Especie, isotipo	Clon	Fuente	Dilución	Inmunógeno	Patrón de tinción
<b>Antígenos</b>						
Caspr2	Ratón, IgG <sub>2a</sub>	S67-25	Novus Biologicals, Littleton, US	1/50, 30 min	Proteína de fusión dominio extracelular (96-1265) de Caspr2 humana.	Citoplásmico granular y membrana.
DCC	Ratón, IgG <sub>2b</sub>	531505	Novus Biologicals	1/50, 30 min	Proteína DCC humana recombinante <i>E.coli</i> .	Citoplásmico granular y membrana.
UNC5A	Conejo, IgG	Policlonal	Lifespan Biosciences, Seattle, US	1/100, 20 min	Péptido sintético 326-375 de UNC5A humana.	Citoplásmico granular y membrana.
<b>Células B y centros germinales</b>						
CD20	Ratón, IgG <sub>2a</sub> kappa	L26	DAKO Glostrup, DK	LpU, 20 min	Células B de amígdala humana.	Lado citoplásmico de la membrana.
<b>Células epiteliales y mioideas</b>						
Citoqueratina	Ratón; IgG <sub>1</sub> kappa	AE1/AE3	DAKO Glostrup, DK	LpU, 20 min	Callo epidérmico humano.	Membrana-citoplasma.
Desmina	Ratón, IgG <sub>1</sub> kappa	D33	DAKO Glostrup, DK	LpU, 20 min	Desmina purificada de músculo humano.	Citoplasma.
<b>Células T reguladoras</b>						
FOXP3	Conejo, IgG	SP97	Master diagnóstico, Granada, ES	1/100, 20 min	Péptido sintético correspondiente al extremo C terminal de FOXP3 humana.	Núcleo.
<b>Marcadores neuroendocrinos</b>						
Cromogranina A	Conejo, IgG	Policlonal	DAKO Glostrup, DK	1/100, 20 min	Cromogranina A aislada de orina humana de pacientes con síndrome carcinoide.	Citoplásmico granular.
<b>Presentación de antígenos</b>						
AIRE	Cabra, IgG	Policlonal	Lifespan Biosciences	1/200, 20 min	Péptido sintético C-QSMARPAAPFPS del extremo C terminal de AIRE humana.	Núcleo. Citoplasma.
MHC de clase II	Ratón, IgG <sub>1</sub> kappa	CR3/43	DAKO Glostrup, DK	1/30, 20 min	Cadena β DP, DQ, DR.	Membrana.
<b>Timocitos y células T</b>						
CD1a*	Ratón, IgG <sub>2b</sub> kappa	12D6	DAKO Glostrup, DK	LpU, 20 min	Proteína recombinante correspondiente al dominio extracelular de la molécula Langerina.	Citoplásmico granular y membrana.
CD3	Ratón, IgG <sub>1</sub> kappa	F7.2.38	DAKO Glostrup, DK	1/50, 20 min	CD3εγδ/CD3ω purificada.	Membrana-citoplasma.

Abreviaturas utilizadas: LpU, Listo para usar; MHC, moléculas de histocompatibilidad.

Para la detección de los anticuerpos, se utilizó un sistema de detección de peroxidasa/3-3' diaminobencidina de *Envision (Dako)*. El procedimiento se realizó en un *Autostainer Link 48* de Dako y las secciones se contratiñeron con hematoxilina.

De entre todas las secciones histológicas, de cada uno de los casos se seleccionó un área representativa (0.8 mm<sup>2</sup>) de cada una de ellas que incluyese: la cápsula, la corteza y la médula. Dos investigadores evaluaron la expresión de: FOXP3, AIRE, CD20, DCC, UNC5A, Caspr2, desmina y cromogranina. El número de linfocitos FOXP3<sup>+</sup> se contó con un aumento de X400 en tres campos diferentes. Los casos con >10 células FOXP3<sup>+</sup>/ campo se definieron como casos positivos, y los casos con ≤10 células por campo como negativos, como se ha descrito por otros autores con anterioridad [300]. En el resto de marcadores (AIRE, CD20, DCC, UNC5A, Caspr2, desmina y cromogranina) se evaluó únicamente la presencia o ausencia de células positivas en el campo estudiado. Para el análisis cuantitativo de los restantes marcadores (CD1a, CD3, CK AE1/AE3, MHC de clase II), las imágenes se adquirieron usando un microscopio digital DMD108 de Leica con las mismas características de iluminación y aumentos en todos los casos. Y las imágenes se analizaron utilizando el software Image J con la herramienta deconvolución del color para seleccionar las áreas con inmunoperoxidasa positiva. Tras convertir las imágenes en binarias, con la herramienta de *thresholding* se midió el área total de tejido (incluyendo el tejido adiposo/conectivo) y se calculó el porcentaje relativo de tejido tímico (definido como área CD3<sup>+</sup>), de corteza (definido como área CD1a<sup>+</sup>) y epitelial (definido como área citoqueratina AE1/AE3<sup>+</sup>). Esta metodología ha sido previamente descrita por otros Leite MI *et al* [301]. Los timomas se clasificaron histológicamente de acuerdo con la clasificación OMS de 2014 (Véase la **Tabla Anexa A4**) y el estadio de los tumores mediante la clasificación de Masaoka [302] (Véase la **Tabla Anexa A5**). El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia (CEIB 2012/0145).

## 11. Inmunoblots y medición de los niveles de anticuerpos anti-AChR.

Para la cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-AChR de los sueros de los pacientes cuyos timomas fueron estudiados por inmunohistoquímica y el estudio de la presencia de marcadores: de miositis, nucleares, titina y IgM anti-MAG se utilizaron los kits de medición descritos en la **Tabla M6**, siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla M6.** *Inmunoblots utilizados en los experimentos.*

	Fuente	Marcadores
<b>Marcadores de miositis (IgG)</b>	<i>DL 1530-1601G;</i> <i>Euroimmun, DE</i>	Mii-2 $\alpha$ , Mii-2 $\beta$ , TIF1 $\gamma$ , MDAS, NXP2, SAE1, Ku, PM-Scl100, PM-Scl75, Jo-1, SRP, PL-7, PL-12, EJ, OJ
<b>Anticuerpos nucleares (IgG)</b>	<i>DL 1590-1601-3G;</i> <i>Euroimmun, DE</i>	Ribonucleoproteínas, DNA doble cadena, nucleosomas, histonas, antígeno nuclear de células en proliferación
<b>Anticuerpos anti-Titina (IgG)</b>	<i>DL 1111-1601,</i> <i>Euroimmun, DE</i>	Titina
<b>Anticuerpos anti-MAG (IgM)</b>	<i>408315,</i> <i>Ravo Diagnostika, DE</i>	MAG

La reactividad de los inmunoblots se detectó usando el software EUROLinScan, que proporciona un valor numérico en base a la intensidad de las bandas. Se consideró como valor positivo la recomendación de un valor >15. Los niveles de anticuerpos anti-AChR se midieron mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*EA 1435-9601G, Euroimmun, DE*) que se reveló con una reacción colorimétrica con una curva patrón de concentraciones conocidas y se realizó una lectura a punto final a 450nm en un espectrofotómetro de microplacas (*Multiskan Spectrum, Thermo Electron Corporation, FI*). Se consideraron como valores positivos valores  $\geq 0.5$ nmol/L.

## 12. Estudios estadísticos.

En los estudios de ensayos con células, la asociación entre variables categóricas (presencia de anticuerpos o categorías clínicas diagnósticas) se evaluó mediante los test  $\chi^2$  y de Fisher's, obteniendo las estimaciones de *odds ratio* (OR). Para evaluar el

valor predictivo de las variables en un diagnóstico específico, se utilizó regresión univariante o regresión logística multivariante, obteniendo un OR ajustado. Valor de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El test  $\text{Chi}^2$  al 95% confianza proporciona una potencia estadística de 0.73, capaz de detectar como significativamente diferente proporciones de 50 y 65%.

En los estudios del tejido tímico, las diferencias de medias de los porcentajes relativos de cada marcador entre grupos de casos y controles se evaluaron mediante el test t-student. Para el estudio de asociación entre variables categóricas (presencia/ausencia de desmina, cromogranina, células FOXP3, AIRE o categorías diagnósticas) se utilizó el test  $\text{Chi}^2$ , obteniendo las estimaciones de OR. Se utilizó un valor de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 13.0 (*SPSS Inc., IL, US*).

## ***RESULTADOS***

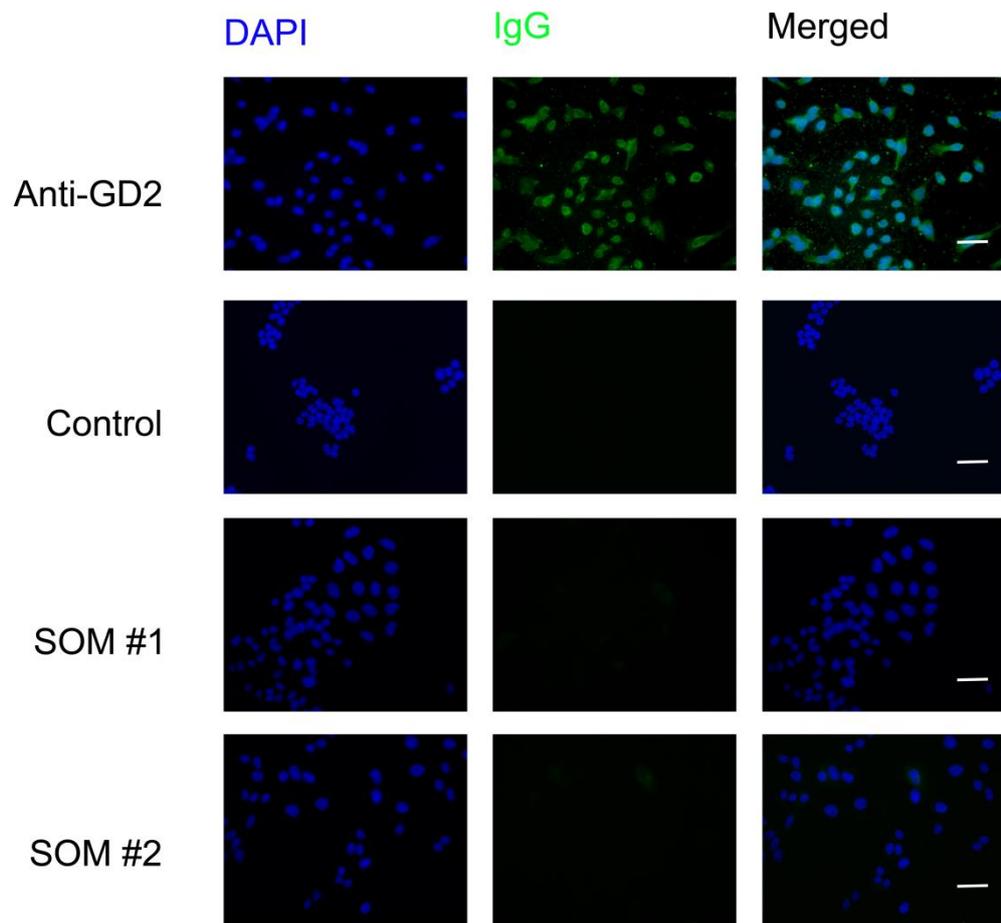


## **1. Reactividad de los sueros de pacientes con SOM.**

### **1.1 Inmunofluorescencias contra la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.**

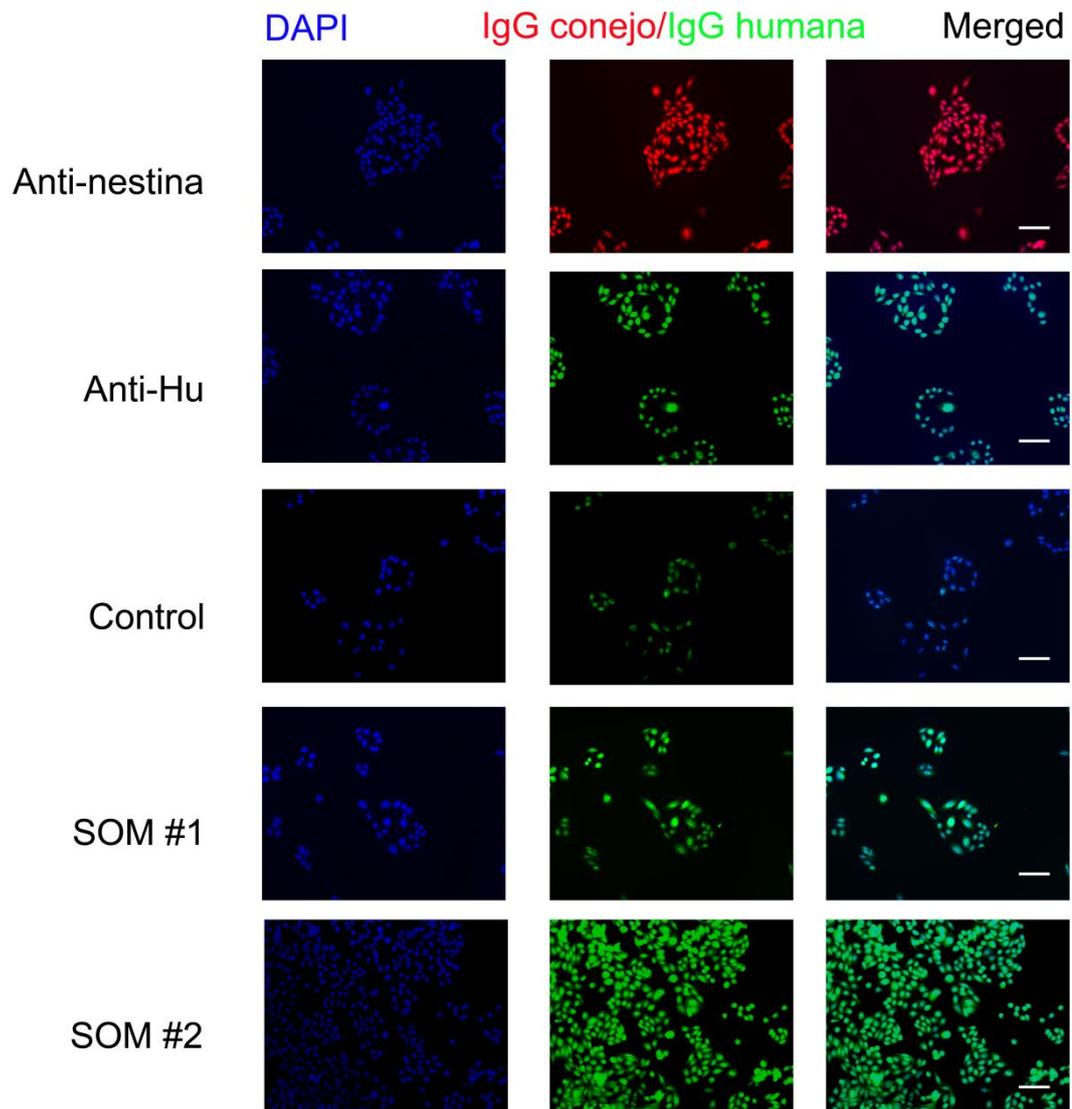
En primer lugar, se comprobó la naturaleza autoinmune de los pacientes con SOM (pediátricos con neuroblastoma o adultos idiopáticos) que utilizaríamos para la realización de las técnicas de inmunoprecipitación. Para ello, se observó la reactividad de IgG humana de los sueros de los pacientes frente a células de neuroblastoma humano (línea celular SH-SY5Y), mediante la realización de inmunofluorescencias incubando los sueros *in vivo* o tras la fijación de las células. Este experimento inicial nos sirvió para definir los patrones de tinción inmunitaria, teniendo especial interés en aquellos sueros que parecían presentar inmunoreactividad de superficie.

Como controles positivos de la técnica *in vivo* necesitábamos anticuerpos de superficie capaces de unirse a la membrana de células sin permeabilizar. Se utilizó líquido cefalorraquídeo de pacientes con anticuerpos frente a NMDAR o AMPAR pero no presentaron reactividad tras varios intentos (a pesar de que cuando las mismas muestras se incubaron en secciones sagitales de cerebro/cerebelo de rata presentaron la reactividad IgG característica frente a estas proteínas). Debido a que no teníamos ninguna muestra con anticuerpos de superficie que pudiesen estar presentes en la línea SH-SY5Y, finalmente se utilizó un anticuerpo comercial frente al gangliósido GD2 como control positivo en las incubaciones *in vivo*. En paralelo se realizó una inmunofluorescencia sobre células SH-SY5Y incubadas con anticuerpos anti-Hu, como control del secundario anti-IgG humana. Ningún suero con SOM mostró reactividad al incubar las células de neuroblastoma *in vivo* **Figura R1.**



**Figura R1.- Los sueros de pacientes con SOM no mostraron reactividad *in vivo* sobre células de neuroblastoma. (Anti-GD2)** El anticuerpo anti-gangliósido GD2 marcó la superficie de las células de neuroblastoma; mientras que los sueros SOM adultos idiopáticos (**SOM #1**) y pediátricos con neuroblastoma (**SOM #2**), al igual que los controles sanos (**Control**), no mostraron ninguna reactividad al incubarlos con células de neuroblastoma sin fijar. Barras escala: 20µm.

Sin embargo, cuando los sueros de pacientes pediátricos con neuroblastoma o adultos idiopáticos con SOM se incubaron con células SH-SY5Y fijadas y permeabilizadas, todos mostraron una reactividad en el citoplasma que no pudo diferenciarse de la reactividad de superficie. Los controles positivos de pacientes con encefalitis y anticuerpos anti-Hu positivos presentaron una tinción nuclear/citoplásmica y los controles negativos de individuos sanos una reactividad similar a la de los pacientes con SOM. No era posible diferenciar la reactividad de individuos sanos de pacientes con SOM **Figura R2.**



**Figura R2.-** Los sueros de pacientes con SOM mostraron reactividad sobre células de neuroblastoma fijadas. (**Anti-nestina**) El anticuerpo anti-nestina marcó el citoesqueleto de las células de neuroblastoma humano; (**Anti-Hu**) El control positivo con encefalitis y anticuerpos anti-Hu positivos marcó el núcleo y el citoplasma de las células de neuroblastoma; Los sueros de adultos idiopáticos con SOM (**SOM #1**) y pediátrico con neuroblastoma (**SOM# 2**) mostraron reactividad intracelular indistinguible de los controles sanos (**Control**). Barra escala: 20µm.

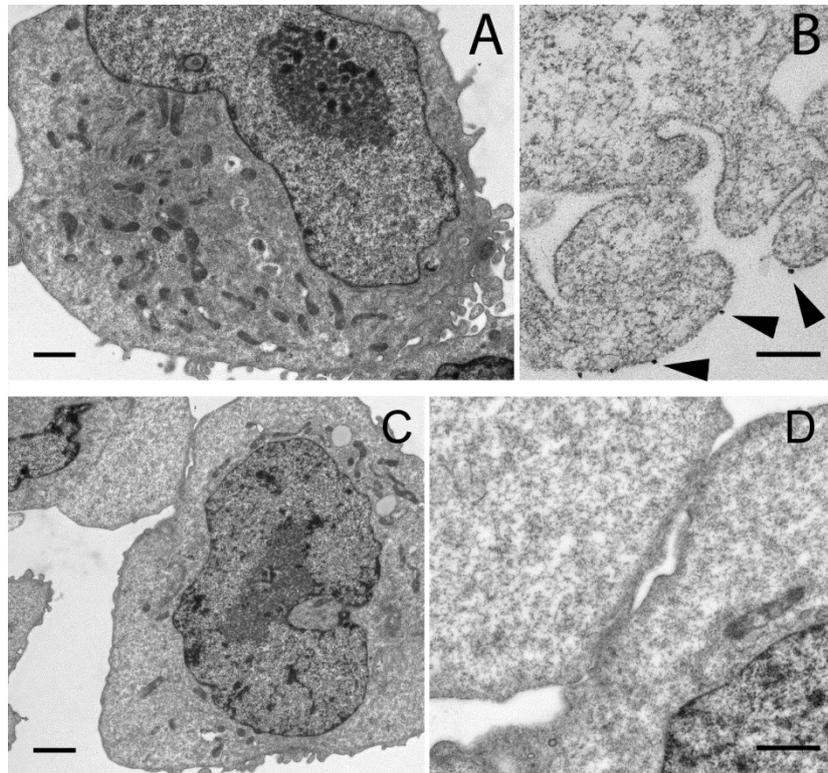
## 1.2 Inmuno oro contra la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

Debido a que los sueros de pacientes con SOM no presentaron reactividad apreciable sobre la superficie celular de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y mediante inmunofluorescencia, el siguiente paso que realizamos fue comprobar si los sueros tenían inmunoreactividad frente a la superficie de las células de neuroblastoma mediante técnicas de microscopía electrónica. Para poder realizar las

inmunoprecipitaciones sobre una monocapa de células de neuroblastoma adheridas al frasco de cultivo, necesitábamos que los sueros tuvieran reactividad frente a la superficie celular. De lo contrario, tras incubar los sueros de los pacientes SOM con las células de neuroblastoma, las IgGs no unidas a la superficie celular se eliminarían con los sucesivos lavados.

Para comprobar si los sueros de pacientes con SOM que íbamos a utilizar en las inmunoprecipitaciones tenían reactividad de superficie, exploramos la inmunoreactividad IgG de los sueros de pacientes con SOM frente a células de neuroblastoma mediante la realización de la técnica inmuno-oro *post-embedding*. Esta técnica consiste en fijar las células para microscopía electrónica con una mezcla de paraformaldehído y glutaraldehído e incubarlas con los sueros de pacientes con SOM durante 96h. Seguidamente se detecta la reactividad con un anticuerpo anti-IgG humana acoplado con partículas de oro de 10 nm de diámetro.

Los sueros de pacientes con SOM presentaron reactividad frente a la superficie de células de neuroblastoma **Figura R3**. Los controles sanos también mostraron un patrón de reactividad similar en la superficie, al igual que sucedía al utilizar las técnicas de inmunofluorescencia (datos no mostrados). No obstante, esta técnica nos permitió comprobar que la reactividad previamente observada en los casos de SOM existía en la superficie celular y, por tanto, podíamos utilizar sueros inmunoreactivos frente a la superficie celular para las inmunoprecipitaciones con células de neuroblastoma.



**Figura R3.- Fotomicrografías representativas de la reactividad en la superficie de células de neuroblastoma (SH-SY5Y). (A, B)** Células de neuroblastoma incubadas con el suero de un paciente con SOM y neuroblastoma con reactividad frente a la membrana celular; **(C, D)** Células de neuroblastoma incubadas con el suero de un individuo sano. Barras de escala: A-C) 2 $\mu$ m y B, D) 200nm.

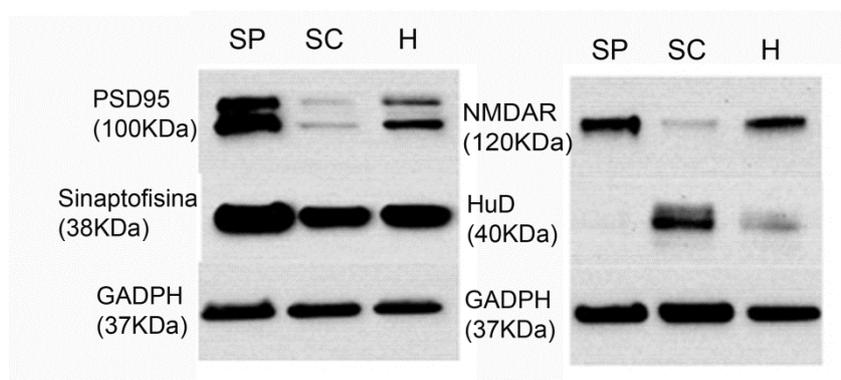
## **2. Validación del proceso de purificación de sinaptosomas utilizados en los experimentos de inmunoprecipitación.**

Los estudios con librerías de DNA codificante y sueros de pacientes con SOM (idiopáticos y paraneoplásicos) señalan la existencia una fuente frecuente de autoantígenos nuevos en la densidad post-sináptica [200]. Por esta razón, con el objetivo de enriquecer el sustrato de la inmunoprecipitación con proteínas de la densidad post-sináptica, los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron con sinaptosomas de tejido nervioso en este trabajo.

### **2.1 Western-blot de las fracciones del proceso de purificación.**

El enriquecimiento de sinaptosomas, que se utilizaron en los experimentos de inmunoprecipitación, se comprobó realizando un Western-blot semicuantitativo con los

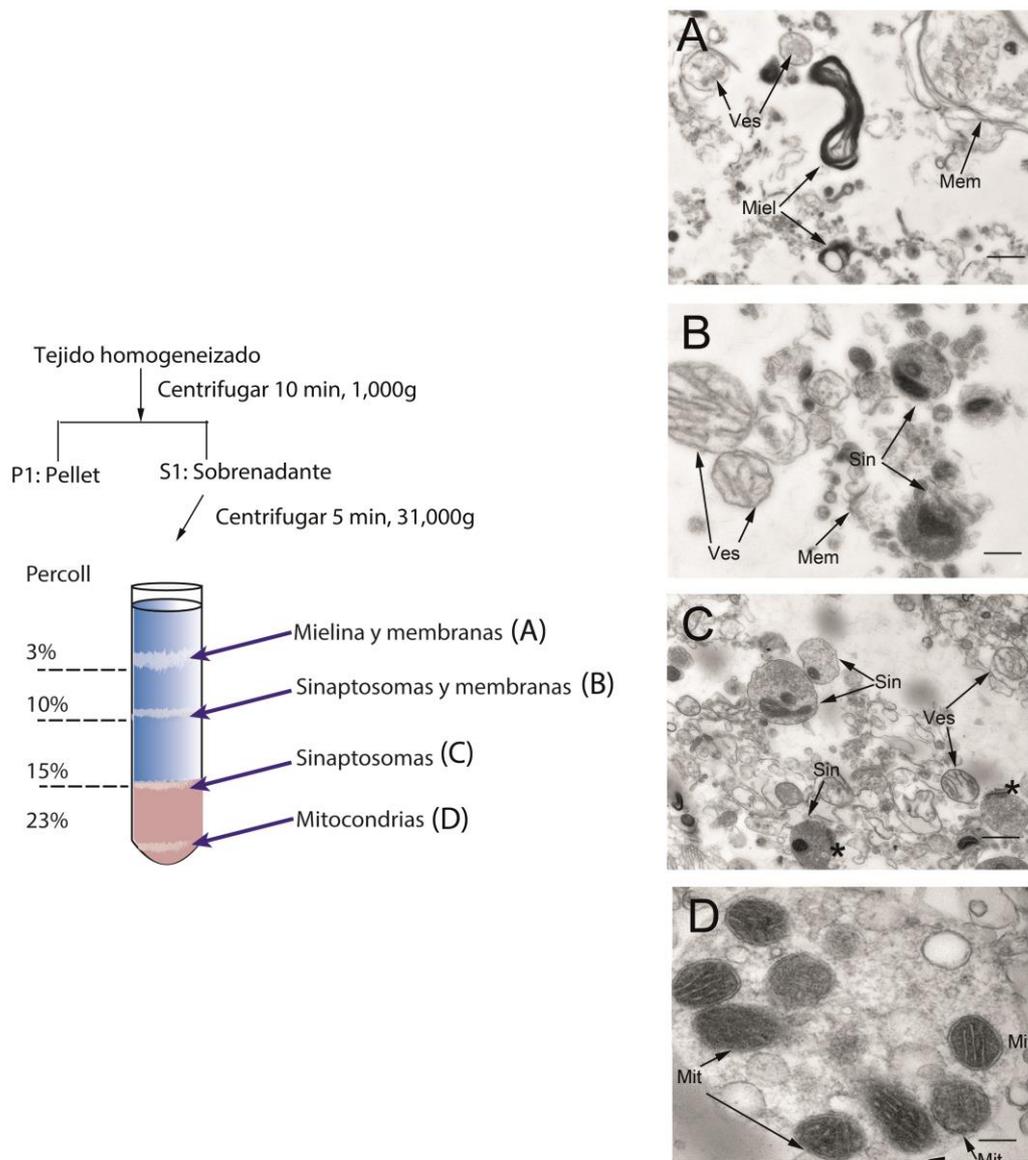
siguientes marcadores: (i) Marcadores pre-sinápticos: proteína sinaptofisina, (ii) Marcadores post-sinápticos: proteína PSD95 y NMDAR, (iii) Marcador citoplásmico y nuclear: proteína HuD. Como control de carga se utilizó la proteína GADPH. La fracción de sinaptosomas purificados contenía una mayor expresión de proteínas pre y post-sinápticas y prácticamente ninguna proteína citoplásmica/nuclear, a diferencia de la fracción de sinaptosomas crudos o el extracto total de cerebro de rata **Figura R4**.



**Figura R4.- Western-blot de las fracciones del proceso de obtención de sinaptosomas de rata.** El Western-blot demostró que la fracción de sinaptosomas purificados se enriqueció en proteínas pre y post-sinápticas. Los marcadores pre-sinápticos (**sinaptofisina**) y post-sinápticos: *Post-synaptic density 95* y *N-methyl D-aspartate receptor* (**PSD95**, **NMDAR**) estaban en mayor cantidad en la fracción de sinaptosomas purificados (SP), mientras que el marcador citoplásmico/nuclear (**HuD**) estaba enriquecido en la fracción cruda de sinaptosomas (SC) y en el extracto total de cerebro de rata (H). Se cargó la misma cantidad de proteína por pocillo de cada una de las muestras. La proteína *Glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase* (**GADPH**) se utilizó como control de la cantidad de proteína cargada en cada pocillo.

## 2.2 Microscopía electrónica de las fracciones del proceso de purificación.

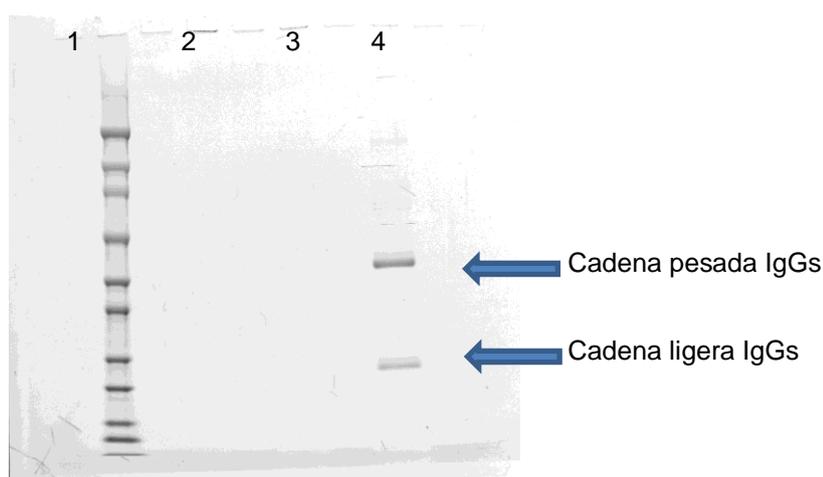
Las fracciones del proceso de obtención de sinaptosomas (fracción de mielina y membranas, sinaptosomas y membranas, sinaptosomas, mitocondrias) se observaron al microscopio electrónico, para comprobar la morfología y que cada fracción aislada en el proceso de separación por gradiente discontinuo de densidad contenía lo que se esperaba. La fracción de sinaptosomas que se utilizó en el proceso de inmunoprecipitación contenía: sinaptosomas con numerosas vesículas sinápticas en su interior y en ocasiones retenían una porción de la membrana post-sináptica **Figura R5**.



**Figura R5.- Esquema del proceso de obtención de sinaptosomas y fotomicrografías de las fracciones aisladas.** El panel de la izquierda muestra el proceso de obtención de sinaptosomas: El tejido nervioso se homogeneizó en un medio isotónico y se centrifugó para eliminar núcleos y restos celulares que no se hubiesen roto. El sobrenadante S1 se aplicó sobre un gradiente discontinuo de Percoll. Tras la ultracentrifugación del sobrenadante S1, se reconocieron cuatro fracciones principales de color crema en las interfases de las capas de Percoll. El panel de la derecha muestra las imágenes de microscopía electrónica de las fracciones recogidas: **(A)** La fracción de mielina y membranas contenía mielina (Miel), membranas (Mem), vesículas membranosas (Ves) y raramente algún sinaptosoma; **(B)** La fracción de sinaptosomas y membranas contenía sinaptosomas con mitocondrias y vesículas sinápticas en su interior (Sin), numerosas membranas (Mem) y vesículas membranosas (Ves); **(C)** La fracción de sinaptosomas estaba compuesta por sinaptosomas de mayor diámetro con numerosas vesículas sinápticas en su interior (Sin) y vesículas membranosas (Ves). Además, en ocasiones, se observó la densidad post-sináptica en algunos sinaptosomas (\*); **(D)** La fracción de mitocondrias contenía predominantemente mitocondrias extrasinápticas. Barra de escala: A-C) 600nm, D) 800nm.

## 2.3 Inmunoprecipitación con sinaptosomas de la proteína NMDAR.

Antes de realizar los estudios de inmunoprecipitación con los casos, se realizó una prueba control de la inmunoprecipitación con sinaptosomas. Los sinaptosomas de rata purificados se incubaron con el suero de un paciente con encefalitis y anticuerpos anti-NMDAR. Con este experimento queríamos verificar si era posible inmunoprecipitar un antígeno usando IgGs humanas específicas y sinaptosomas en el medio isotónico necesario para que mantuviesen su estructura **Figura R6**.



**Figura R6.- Electroforesis de las proteínas inmunoprecipitadas con sinaptosomas purificados y suero con anticuerpos anti-NMDAR.** (Carrera 1) Escalera de peso molecular; (Carreras 2,3) Proteínas inmunoprecipitadas con sueros control; (Carrera 4) Proteínas inmunoprecipitadas con suero con IgG frente NMDAR. Se observaron las bandas de la cadena pesada (55KDa) y ligera de las IgGs (27KDa) (flechas) y otras bandas tenues de proteínas inmunoprecipitadas.

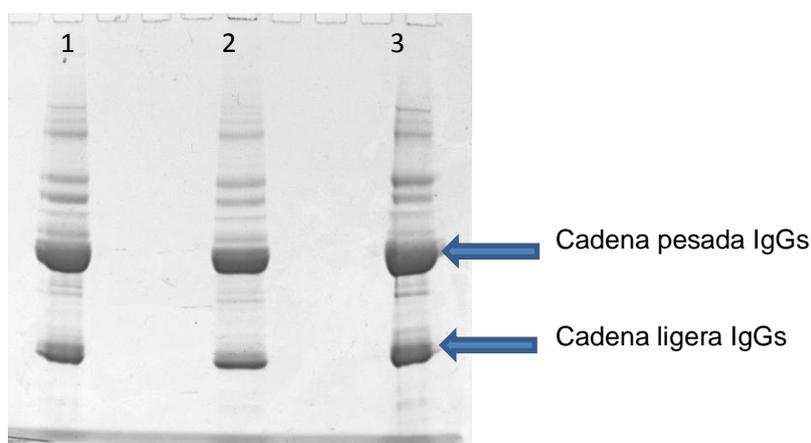
En este experimento se inmunoprecipitaron las secuencias HSQLSDLYGK, FQRPNDFSPFR, DKEGLRDFYLDQFR, EFDEIELAYR de la subunidad 2b del receptor ionotrópico de glutamato activado por NMDA (gi|4099613) (valor de Unused de 4.32 y % cobertura de 47.83). Con este experimento se comprobó que se podían inmunoprecipitar proteínas de la membrana post-sináptica de los sinaptosomas purificados usando los sueros de pacientes con anticuerpos.

### 3. Inmunoprecipitaciones con sueros de pacientes con SOM.

#### 3.1 Inmunoprecipitación y preselección de proteínas identificadas.

Se utilizaron los sueros de los pacientes seleccionados (aquellos que mostraron reactividad de superficie mediante microscopía electrónica) y los sueros de individuos control (individuos sanos o con otras patologías) en una misma serie de experimentos de inmunoprecipitación. En estas inmunoprecipitaciones se emplearon tres sustratos: sinaptosomas crudos o purificados y células de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y (Véase la **Tabla M1** que recoge el conjunto de experimentos de inmunoprecipitación que se realizaron).

Se separaron las proteínas inmunoprecipitadas por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida Bis-Tris 4-12% en condiciones MOPS-SDS. Tras teñir los geles con Azul de Coomassie, se comprobó que en ningún caso existían bandas diferenciales de proteínas inmunoprecipitadas por los sueros de los controles o los sueros de pacientes con SOM **Figura R7**.



**Figura R7.-** Gel de electroforesis representativo con proteínas inmunoprecipitadas utilizando sinaptosomas crudos. (Calle 1) Suero de paciente con SOM y neuroblastoma; (Calle 2) Suero de individuo sano; (Calle 3) Suero de paciente con SOM y neuroblastoma. Nótese que en este caso la concentración de proteínas inmunoprecipitadas es mucho mayor que en el caso anterior utilizando sinaptosomas purificados como sustrato de la inmunoprecipitación (Figura R6).

Se secuenciaron las carreras completas de todos los geles, excluyendo del análisis las bandas de las IgGs ya que suponían un exceso de proteínas respecto al resto de proteínas en menor proporción. Para asegurarnos de no perder proteínas con movilidad electroforética similar a las cadenas de las IgGs, se evaluaron todos los fragmentos peptídicos en cada una de las carreras, y las bandas de las IgGs se analizaron por separado por espectrometría de masas (LC-MS/MS). Debido a la gran variabilidad en la cantidad de proteínas inmunoprecipitadas dependiendo del sustrato utilizado (Véanse los geles de la **Figura R6 y R7**), la abundancia de las proteínas se utilizó únicamente para evaluar la presencia o ausencia de proteínas entre los experimentos de inmunoprecipitación con casos y controles. Si una proteína era identificada por casos y controles (individuos sanos o con otras enfermedades) se eliminaba de la lista, mientras que si la proteína era inmunoprecipitada por los casos, y no por los controles, se incluía en la lista de proteínas identificadas exclusivamente por los casos objeto de estudio. En la **Tabla R1** se muestra un ejemplo del proceso de preselección que llevamos a cabo.

**Tabla R1.** Preselección de proteínas inmunoprecipitadas exclusivamente por casos.

Proteína	Código NCBI	SOM	NMT	Encefalitis -IgLON5	Individuos sanos	Resultado
<i>NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 10</i>	gi 170295834	0.003	0.005	0.052	0.015	×
<i>Vitamin D-binding protein</i>	gi 51172612	0.002	0	0.001	0.002	×
<i>Contactin-associated protein-like 2</i>	gi 7662350	0	0.060	0	0	√
<i>Cytoskeleton-associated protein 4 isoform X1</i>	gi 564358768	0.010	0	0	0	√
<i>IgLON family member 5</i>	gi 109461814	0	0	0.384	0	√

Abreviaturas utilizadas: NCBI, *National centre for biotechnology information*; NMT, neuromiotonía; SOM, síndrome opsoclonus-mioclonus. ×Proteína eliminada; √ Proteína seleccionada.

### 3.2 Proteínas inmunoprecipitadas por sueros de pacientes con SOM y neuroblastoma.

Los sueros de pacientes con SOM pediátricos y neuroblastoma inmunoprecipitaron 706 proteínas. Del total de proteínas se eliminaron: (1) 550 proteínas identificadas comúnmente en experimentos de inmunoprecipitación usando sueros control y (2) 118 proteínas consideradas no específicas o posibles contaminaciones, por ejemplo: proteínas de la piel, plasma, Igs u otras proteínas identificadas de otras especies sin equivalencia humana. De las 38 proteínas restantes, ninguna se precipitó por más de un suero y solamente ocho fueron identificadas por el mismo suero en más de un experimento (Véase la **Figura R8**).

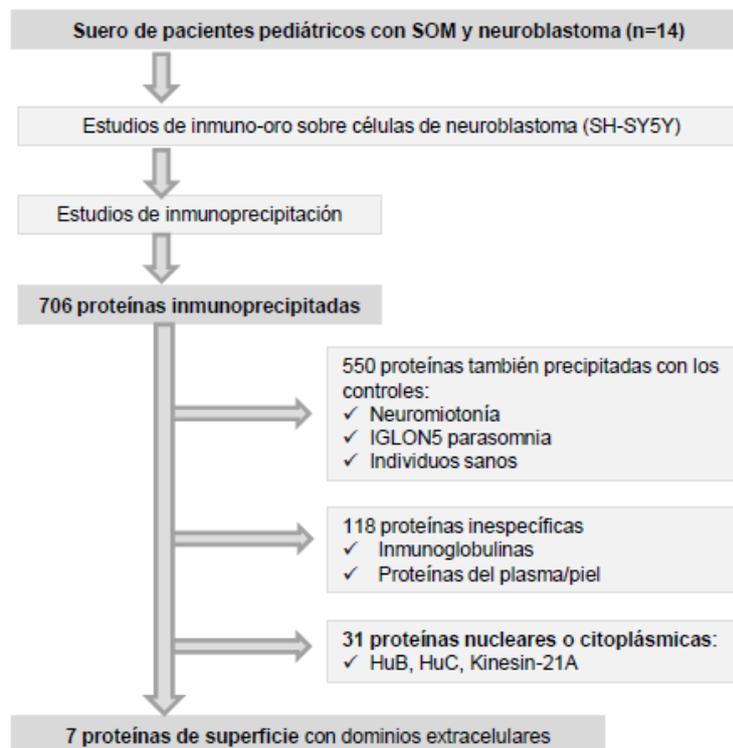


Figura R8.- Diagrama de flujo de experimentos y resultados con sueros de pacientes con SOM y neuroblastoma.

### 3.2.1 Análisis funcional y bibliográfico de fenotipos mutantes de las proteínas de superficie inmunoprecipitadas por pacientes con SOM y neuroblastoma.

Para identificar aquellas proteínas que eran accesibles para los anticuerpos se realizó un análisis de la localización subcelular de las proteínas identificadas utilizando la base de datos *universal protein resource* (disponible en [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Solamente siete tenían localización en la membrana celular y las 31 restantes tenían una localización intracelular (citoplásmica o nuclear). Las proteínas intracelulares incluían tres proteínas previamente probadas como autoantígenos en pacientes con SOM u otros síndromes neurológicos paraneoplásicos: *ELAV-like neuronal protein 1* (HuB), *ELAV-like neuronal protein 3* (HuC) y *Kinesin family member 21A* (KIF21A) [200]. El grupo de proteínas expresadas en la membrana celular incluía siete proteínas que se expresaban en el sistema nervioso. Puede verse una lista de todas las proteínas en la **Tabla R2**.

Además, se realizó un análisis bibliográfico de la función de las proteínas preseleccionadas utilizando la base de datos OMIM disponible en [www.omim.org](http://www.omim.org) y la base de datos de fenotipos *knock out* (KO) de ratón MGD disponible en [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org). Las mutaciones genéticas en dos de estas proteínas se asocian con enfermedades neurológicas humanas: *Potassium voltage-gated channel subfamily C member 3 Kv 3.3 (KCNC3)* se relaciona con la ataxia espinocerebelosa 13 (entrada de OMIM: [176264](http://www.omim.org/entry/176264)), *Neurobeachin A (NBEA)* se asocia con el autismo (entrada de OMIM: [604889](http://www.omim.org/entry/604889)).

**Tabla R2.** Proteínas inmunoprecipitadas por pacientes pediátricos con SOM y neuroblastoma. Se resaltan las proteínas de membrana.

Proteína	Gen	Código NCBI	Localización Subcelular	Unused Total	Sustrato
<i>α-ketoacyl CoA thiolase</i>	POT1	gi118426866	Peroxisomas	2.77	SC
<i>60S acidic ribosomal protein P1</i>	RPLP1	gi14506669	Ribosomas	2	NB
<i>Actin, alpha skeletal muscle 2</i>	ACTN2	gi1556994436	Citoplasma	4.05	SP
<i>Ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein BTBD11</i>	BTBD11	gi165786661	Membrana	2.01	SC
<i>Annexin A1</i>	ANXA1	gi1433552018	Núcleo	4.17; 3.17	NB
<i>Arg/Abl-interacting protein</i>	SORBS2	gi1149021399	Citoplasma	3.8	SC
<i>Arginine methyltransferase</i>	PRMT7	gi11808646	Núcleo	9.38	SC
<i>Aspartate beta-hydroxylase domain-containing protein 2</i>	ASPHD2	gi157528390	Membrana	4.02	SC
<i>Beta-hydroxybutyrate dehydrogenase</i>	BDH	gi168837285	Mitocondria	2	SP
<i>cAMP and cAMP inhibited cGMP 3' 5'-cyclic phosphodiesterase 10A</i>	PDE10A	gi149168618	Citoplasma	2	SC
<i>Caprin-1</i>	CAPRIN1	gi1564342082	Citoplasma	2.01	SC
<i>cGMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase 2A</i>	PDE2A	gi1396578149	Citoplasma	2	SC
<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 6</i>	CHCHD6	gi1157819769	Membrana	3.62	SP
<i>Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1</i>	FAM120A	gi1300797015	Núcleo	2.02	SC
<i>Cytoskeleton-associated protein 4</i>	CKAP4	gi1564358768	Citoplasma	5.6	SC
<i>ELAV-like neuronal protein 1 (HuB)</i>	ELAVL2	gi1521144	Núcleo	7.91; 2.2	SC
<i>ELAV-like protein 3 (HuC)</i>	ELAVL3	gi149355761	Núcleo	9.54; 9.36	SC
<i>Galectin-3-binding protein</i>	LGALS3	gi15031863	Membrana	1.46	SC
<i>GrpE protein</i>	GRPEL1	gi1189053577	Matriz	1.4	NB
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>	SYNCRIP	gi1119569014	Núcleo	2	NB
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2</i>	HNRNPC	gi162088634	Núcleo	3.92	SC
<i>Isocitrate dehydrogenase 2</i>	IDH2	gi162079055	Mitocondria	3.11	SP
<i>Kinesin family member 21A</i>	KIF21A	gi1564309249	Citoplasma	1.96	SC
<i>La-related protein 1</i>	LARP4B	gi1530380470	Citoplasma	2	SC
<i>Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2</i>	LRRFIP2	gi18923224	Citoplasma	2	NB
<i>Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1</i>	PITPNM1	gi156605814	Citoplasma	30.99; 4.37	SC
<i>Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1-like</i>	MTHFD1L	gi1313151179	Mitocondria	2	SP
<i>Muscle blind-like splicing regulator 2</i>	MBNL2	gi1530423291	Núcleo,	3.66	SC
<i>Neurobeachin</i>	NBEA	gi162422577	Membrana	2.24	SC
<i>Polyadenylate-binding protein cytoplasmic 1</i>	PABPC1	gi1693937	Núcleo	15.71; 5.83	SC
<i>Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1</i>	PNPASE	gi18928246	Mitocondria	2.66	SP
<i>Protein arginine N-methyltransferase 8</i>	PRMT8	gi174099699	Citoplasma	13.82	SC
<i>Serine/Threonine-protein kinase LMTK3-like</i>	LMTK3	gi1564328414	Membrana	7.85; 4.26	SC
<i>Shaw type potassium channel Kv3.3</i>	KCNC3	gi1564327895	Membrana	1.92; 1.95	SC
<i>Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3</i>	SLC2A3	gi148146943	Membrana	4	SC
<i>Superoxide dismutase 1</i>	MSD1	gi18394331	Matriz	6.38	SC
<i>Tripartite motif-containing protein 46</i>	TRIM46	gi1530365394	Intracelular	12.76; 4.5	SC
<i>Ubiquilin 2</i>	UBQLN2	gi13970874	Núcleo	2	SC

Abreviaturas utilizadas: SC, sinaptosomas crudos; SP, sinaptosomas purificados; NB, neuroblastoma.

El fenotipo de los mutantes para el gen *KCNC3* en ratones y humanos se solapa con el que presentaban pacientes con SOM [303-305]. En humanos el fenotipo de los pacientes con mutaciones en el gen *KCNC3* y ataxia espinocerebelosa 13 incluye las siguientes características clínicas: ataxia cerebelosa, disartria, nistagmo, hipotonía con debut progresivo y lento, además de signos de atrofia pontina y cerebelosa en los estudios de resonancia magnética cerebral (fenotipo OMIM: [605259](#)).

Puede verse un resumen del análisis bibliográfico de las funciones de las proteínas de superficie inmunoprecipitadas por los pacientes pediátricos con SOM en la **Tabla R3**.

**Tabla R3.** *Proteínas de membrana inmunoprecipitadas exclusivamente por el suero de pacientes SOM con neuroblastoma.*

Proteína	Gen	Enfermedad asociada (OMIM)	Función celular	Expresión en el Sistema Nervioso	Modelo animal KO (MGD)
<i>Ankyrin repeat BTB/POZ domain-containing protein BTBD11</i>	<i>BTBD11</i>	N/D	Mediador de la ruta de señalización PTEN.	Cerebro, cerebelo y médula espinal.	Sin alteraciones del fenotipo <a href="#">MGI:1921257</a>
<i>Aspartate beta-hydroxylase domain-containing protein 2</i>	<i>ASPHD2</i>	N/D	Dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato.	Cortex y ventrículos laterales.	N/D <a href="#">MGI:1920148</a>
<i>Galectin-3-binding protein precursor</i>	<i>LGALS3</i>	No ( <a href="#">153619</a> )	Implicada en respuestas agudas inflamatorias.	Microglia [306].	Trastornos del metabolismo de la glucosa e inflamación sistémica [307].
<i>Neurobeachin 1</i>	<i>NBEA</i>	Autismo ( <a href="#">604889</a> )	Ancla a la membrana la proteína quinasa A.	Cortex (especialmente el cortex frontal y occipital) [308].	El mutante nulo muere perinatalmente con un bloqueo completo de la transmisión en la unión neuromuscular. La línea de ratón KO gene-trap en el día embrionario 18 tiene potenciales de acción y miniatura reducidos [309].
<i>Potassium voltage-gated channel subfamily C member 3</i>	<i>KCNC3</i>	Ataxia espinocerebelosa 13 ( <a href="#">176264</a> )	Activación e inactivación de cinética rápida que permite a las neuronas descargar trenes de potenciales de acción de alta frecuencia [310].	Cerebelo, tronco cerebral, ganglios basales y médula espinal [311].	Ratones sin Kv 3.3 ni Kv3.1 presentan ataxia, temblor y mioclonía. El fenotipo es más atenuado en ratones a los que solo les falta una de las subunidades [312].
<i>Serine/threonine-protein kinase LMTK3-like</i>	<i>LMTK3</i>	N/D	Tráfico endocítico de receptores metil-D-aspartato en neuronas.	Cortex, tálamo, cerebelo e hipocampo.	Hiperactividad motora [313].

Abreviaturas utilizadas: N/D, información no disponible; OMIM, *Online mendelian inheritance man database*; MGI, identificador de fenotipos KO de *Mouse genome database* (MGD) disponible en [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org).

La secuencias y cobertura de los péptidos de la proteína Kv 3.3 que se identificaron con el mismo suero en dos experimentos independientes puede verse en la **Figura R9**. En ambos experimentos de inmunoprecipitación se aisló el dominio de la proteína denominado BTB/POZ. Una de las proteínas que comparten este dominio es la denominada *BTB/POZ domain-containing potassium channel tetramerization domain 7*, una proteína cuyas mutaciones se relacionan con un síndrome similar al SOM y ataxia de aparición temprana [314].

### Experimento 1

Péptidos	Unused	Cobertura (%)	Códigos NCBI	Especie	
vinvggvr; lpgtrlagltepeaaar	1.92	5.12	gi 564327883; gi 57113839; gi 5643327895; gi 5643327889; gi 564327887; gi 564327885; gi 564327899; gi 564327893; gi 564327891	<i>Rattus norvegicus</i>	
mlssvcvwsf cpggrraep epeaaarfdy tdveaccwmt gelkrlcfqd ilisittfcl tfeflmrvtf rilrifkltr lgsnhtyfkn nnfgmyysla itppsmgvtv gndlgvleeg lvt dyapspd	sgrqgtrkqh csglpavamg dpgtdefffd yrqhrdaeea agggaggpag ethegfihis cpdkveflks hfvglrvlgh ipigfwavv makqklpkkk agayppgpht vdprpngdpa gsirkgyeks	sqpaptpppp rhgggggdsg rhpgvfayvl ldsfeapdss gpggaggtww nktvtqaspi slniidcvai tcrastnefl tmttlgygdm nkhprppqp hpgllrggag aaalahedcp rslssivgls	esspppllpp kivinvggvr hetyrstlrt nyyrtgklhc gnananagga pgappenitn lpfylevgls lliiiflalgv ypkwtsgmlv gspnyckpdp glgimglppl aidqpamspe gvslrlapla	pqqqcaqpgt hetyrstlrt padvcgplfe hdaglddeag fedpyssraa vevetepflt glsskaakdv lifatmiyya galcalagvl pppppphphh papepcpla dkspitpgsr tppgspratr	aaspagapls lpgtrlaglt eelgfwgide aggggldgag ryvafaslff yvegvcvwwf lgflrvrvfv erigadpddi tiampvpviv gsggispppp qeevietnra grysrdracf rapptlpsil

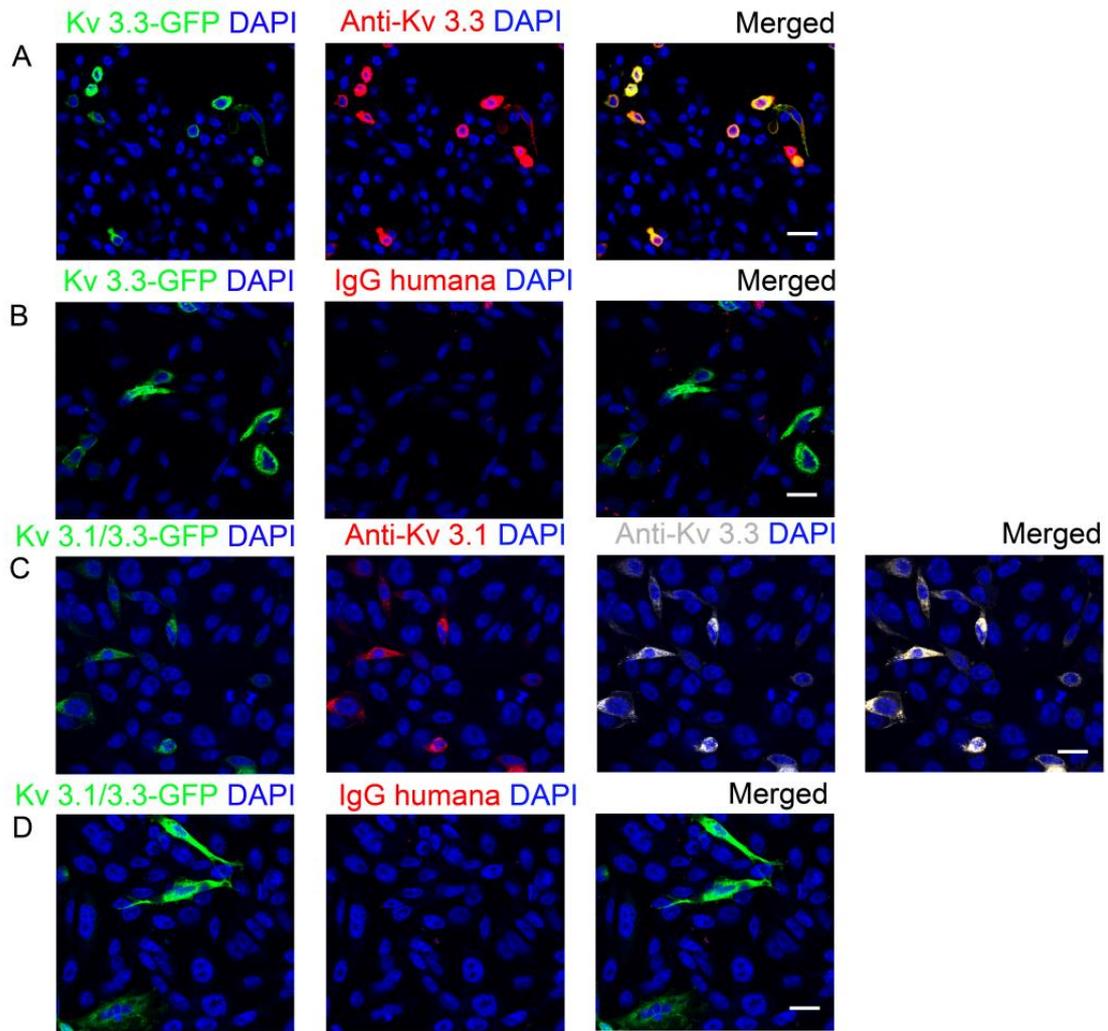
### Experimento 2

Péptidos	Unused	Cobertura (%)	Códigos NCBI	Especie	
lagltepeaaar; eegvdpr	1.95	3.24	gi 564327895; gi 564327889; gi 564327883; gi 564327899; gi 564327897; gi 5624327893; gi 564327891; gi 564327887; gi 564327885	<i>Rattus norvegicus</i>	
mlssvcvwsf cpggrraep epeaaarfdy tdveaccwmt gelkrlcfqd ilisittfcl tfeflmrvtf rilrifkltr lgsnhtyfkn nnfgmyysla itppsmgvtv gndlgvleeg lvt dyapspd	sgrqgtrkqh csglpavamg dpgtdefffd yrqhrdaeea agggaggpag ethegfihis cpdkveflks hfvglrvlgh ipigfwavv makqklpkkk agayppgpht vdprpngdpa gsirkalvta	sqpaptpppp rhgggggdsg rhpgvfayvl ldsfeapdss gpggaggtww nktvtqaspi slniidcvai tcrastnefl tmttlgygdm nkhprppqp hpgllrggag aaalahedcp	esspppllpp kivinvggvr hetyrstlrt nyyrtgklhc gnananagga pgappenitn lpfylevgls lliiiflalgv ypkwtsgmlv gspnyckpdp glgimglppl aidqpamspe	pqqqcaqpgt hetyrstlrt padvcgplfe hdaglddeag fedpyssraa vevetepflt glsskaakdv lifatmiyya galcalagvl pppppphphh papepcpla dkspitpgsr	aaspagapls lpgtrlaglt eelgfwgide aggggldgag ryvafaslff yvegvcvwwf lgflrvrvfv erigadpddi tiampvpviv gsggispppp qeevietnra grysrdracf

**Figura R9.- Identificación de la proteína potassium voltage-gated channel subfamily C member 3 (Kv3.3).** Panel inferior: Péptidos identificados en la secuencia de la proteína de rata Kv 3.3 (Identificadores de secuencia de la base de datos de proteínas del NCBI gi| 564327883 o gi| 564327895).

### 3.2.2 Inmunofluorescencias sobre células HEK293T transfectadas con canales de potasio.

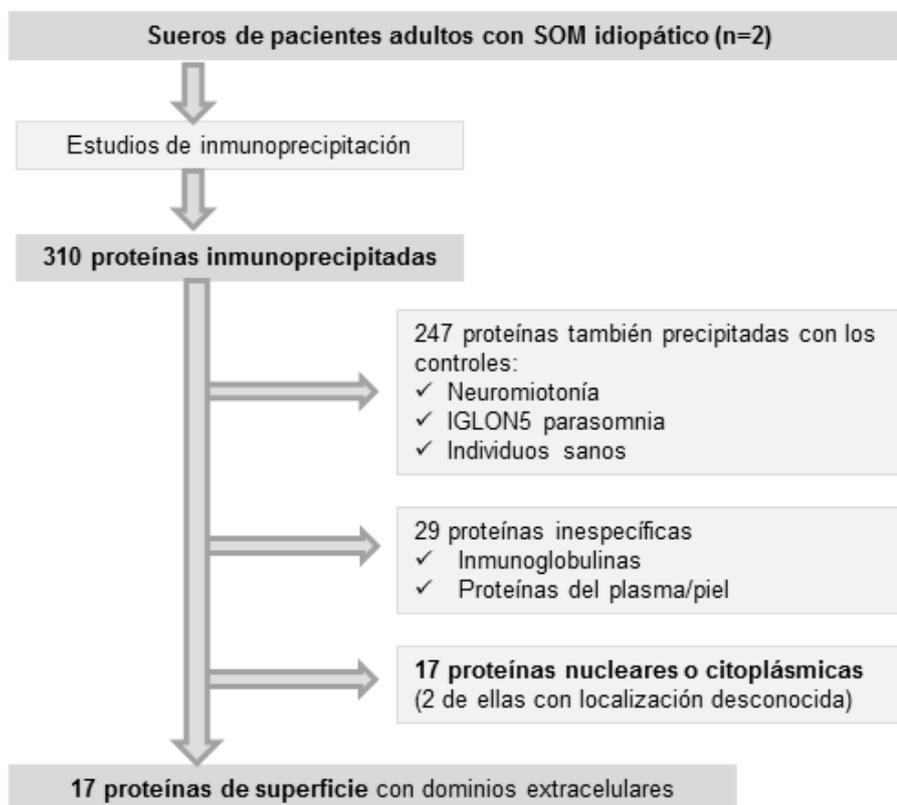
Para comprobar si los pacientes con SOM tenían anticuerpos frente al del canal de potasio Kv 3.3 se transfectaron células HEK293T con plásmidos que contenían las secuencias de los genes humanos *KCNC1*, *KCNC2*, *KCNC3* y *KCNC4*. Se expresaron las subunidades Kv 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 aisladas o en combinaciones equimolares de Kv 3.3 con las subunidades Kv 3.1, 3.2 o 3.4. Las células transfectadas con la/s subunidad/es del canal/es de potasio se incubaron, *in vivo* o con células fijadas, con 14 sueros pediátricos con SOM y neuroblastoma. Se amplió el estudio de reactividad frente a Kv3.3 aislada o la combinación Kv3.1/3.3 *in vivo* o con células fijadas con: sueros pediátricos con SOM (n=10), sueros de adultos idiopáticos (n=10) y sueros de adultos paraneoplásicos (n=10, cuatro con SCLC, tres con cáncer de mama, uno con cáncer de pulmón de células no pequeñas, uno con cáncer de testículo y uno con cáncer renal). Todos los casos resultaron negativos, ningún suero mostró reactividad frente a subunidades aisladas o en combinación del canal de potasio dependiente de voltaje tipo C **Figura R10**. También se eliminó la etiqueta de la proteína verde fluorescente (GFP) del extremo C-terminal de la proteína cortando la secuencia codificante del plásmido con enzimas de restricción, para descartar un defecto estructural en el canal. No se detectó reactividad específica en los sueros de pacientes pediátricos con SOM y neuroblastoma frente a Kv3.3 aislado ni frente a la combinación Kv3.3/3.1 sin la etiqueta GFP (datos no mostrados). Debido a que la proteína *BTB/POZ domain-containing potassium channel tetramerization domain 7* se relaciona con los canales de potasio y las mutaciones en el gen que la codifica se relacionan con un fenotipo similar al SOM, también se evaluó esta proteína en ensayos con células HEK usando 14 sueros pediátricos con neuroblastoma pero todos resultaron negativos (datos no mostrados).



**Figura R10.- Inmunofluorescencia *in vivo* sobre células HEK293T transfectadas con Kv 3.3 o la combinación Kv 3.1/3.3.** Se incubaron los sueros de pacientes con SOM con células HEK293T sin fijar transfectadas con un plásmido que codificaba para Kv3.3 etiquetado con la proteína verde fluorescente (GFP) o combinaciones de Kv3.3 con Kv3.1, 3.2 o 3.4, para comprobar si contenían anticuerpos dirigidos frente al canal Kv3.3 o su combinación con otras subunidades. No se observaron diferencias entre pacientes y sueros control. (A) Células HEK293T transfectadas con Kv3.3-GFP (verde) incubadas con el anticuerpo comercial anti-Kv3.3 (rojo); (B) Células HEK293T transfectadas con Kv3.3-GFP (verde) incubadas con el suero del paciente con SOM y neuroblastoma que inmunoprecipitó el canal (rojo). No se detectó reactividad específica (tampoco reactividad específica en células HEK293T fijadas o transfectadas con el gen *KCNC3* sin la etiqueta GFP [datos no mostrados]); (C) Células HEK293T transfectadas con Kv3.3/Kv3.1-GFP (verde) incubadas con el anticuerpo comercial anti-Kv3.3 (gris) y el anticuerpo anti-Kv3.1 (rojo); (D) Células HEK293T transfectadas con Kv3.3/3.1-GFP (verde) incubadas con el suero del paciente con SOM y neuroblastoma que inmunoprecipitó el canal Kv 3.3. No se detectó reactividad específica (tampoco en células transfectadas con la combinación de los genes *KCNC3/KCNC1* fijadas o sin la etiqueta GFP [datos no mostrados]). Barra de escala: 20µm.

### 3.3 Proteínas inmunoprecipitadas por sueros de pacientes con SOM idiopático.

Los sueros de pacientes adultos idiopáticos con SOM inmunoprecipitaron 310 proteínas utilizando los sustratos de sinaptosomas purificados y crudos. Del total de proteínas se eliminaron: (1) 247 proteínas identificadas comúnmente en experimentos de inmunoprecipitación usando sueros control y (2) 28 proteínas consideradas no específicas o posibles contaminaciones, por ejemplo: proteínas de la piel, plasma, Igs u otras proteínas identificadas de otras especies sin equivalencia humana. De las restantes 35 proteínas, todas tenían expresión en el SNC **Figura R11, Tabla R4.**



**Figura R11.-Diagrama de flujo de experimentos y resultados del paciente adulto con SOM idiopático.**

**Tabla R4.** *Proteínas inmunoprecipitadas exclusivamente con sueros de pacientes adultos con SOM idiopáticos.* Se resaltan las proteínas de membrana.

Proteína	Gen	Código NCBI	Localización subcelular	Unused Total	Sustrato
<i>Actin, alpha skeletal muscle 2-like isoform X2</i>	LOC102364634	gi 556994436	Citoplasma	8.1	SP
<i>A-kinase anchor protein 12</i>	AKAP12	gi 564325145	Membrana, citoplasma	1.72	SC
<i>ARF GTPase-activating protein GIT1</i>	GIT1	gi 4691726	Citoplasma	1.51	SC
<i>CaM kinase-like vesicle-associated protein</i>	CAMKV	gi 22760572	Membrana del soma y neuritas	2	SC
<i>cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta</i>	PRKACB	gi 59799765	Membrana, citoplasma, núcleo	1.72	SC
<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial</i>	UQCRC1	gi 57114330	Membrana mitocondrial interna	4	SP
<i>DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial</i>	DNAJA3	gi 12835839	Membrana, matrix mitocondrial, citoplasma	2.1	SC
<i>Dual specificity protein phosphatase 14</i>	DUSP14	gi 5902002	Citoplasma, mitocondria, núcleo	2.01	SP
<i>G-protein coupled receptor family group 5 member D</i>	GPRC5D	gi 556778447	Membrana	4.49	SC
<i>GrpE protein homolog 1, mitochondrial</i>	GRPEL1	gi 13324704	Matriz mitocondrial	1.38	SP
<i>Leucine-rich repeat-containing protein 15</i>	LRRCL15	gi 556742139	Membrana	5.48	SC
<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog</i>	TOMM20	gi 149243996	Membrana mitocondrial externa	2	SC
<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM70</i>	TOMM70	gi 119600229	Membrana mitocondrial externa	2	SC
<i>MTSS1-like protein</i>	MTSS1L	gi 2803855	N/D	2	SC
<i>Multifunctional protein ADE2</i>	ADE2	gi 11709928	Citoplasma	17.11	SC
<i>Nuclease EXOG, mitochondrial</i>	EXOG	gi 27369613	Membrana mitocondrial interna	2.9	SC
<i>Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2 isoform X2</i>	GP2	gi 555967179	Membrana, anclaje lipídico, secretada	1.86	SP
<i>Phospholipid phosphatase 3</i>	PLPP3	gi 29422123	Membrana, aparato de Golgi	2	SC
<i>Protein dispatched homolog 2</i>	DISP2	gi 81866449	Membrana	2	SC
<i>Protein NipSnap homolog 2</i>	GBAS	gi 4503937	Membrana, mitocondria	1.82	SP
<i>Protein unc-13 homolog A</i>	UNC13A	gi 374095515	Membrana	2	SC
<i>Selenium-binding protein 1</i>	SELENBP1	He	Membrana, citoplasma, núcleo	3.51	SP
<i>Serine/threonine-protein kinase MRCK beta</i>	CDC42BPB	gi 149044095	Membrana, citoplasma	13	SC
<i>Serine/threonine-protein kinase mTOR</i>	MTOR	gi 448262431	Citoplasma, membrana mitocondrial externa.	2.05	SC
<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3</i>	ATP1B3	gi 149018859	Membrana, melanosomas	3.29	SC
<i>Solute carrier family 16 member 1</i>	SLC16A1	gi 191144	Membrana	1.6	SC
<i>Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3</i>	SLC2A3	gi 585228	Membrana	4	SC
<i>Solute carrier family 25 member 42</i>	SLC25A42	gi 258547124	Membrana mitocondrial interna	2	SC
<i>Solute carrier family 25 member 51</i>	SLC25A51	gi 67078454	Membrana mitocondrial interna	2	SC
<i>Synaptotagmin-12</i>	SYT12	gi 29366828	Citoplasma	1.37	SC
<i>Syntaxin-16</i>	STX16	gi 2352814	Citoplasma, membrana del aparato de Golgi	2	SC
<i>Triple functional domain protein uncharacterized protein</i>	TRIO	gi 3522970	Citoplasma	4.71	SC
<i>uncharacterized protein</i>	LOC102178767	gi 548510463	N/D	21.99	SC
<i>V-set and immunoglobulin-domain-containing protein 8</i>	VSIG8	gi 556773245	Membrana	1.44	SP

Abreviaturas utilizadas: SC, sinaptosomas crudos; SP, sinaptosomas purificados; NB, neuroblastoma.

### 3.3.1 Análisis funcional y bibliográfico de fenotipos mutantes de las proteínas inmunoprecipitadas por pacientes con SOM idiopático.

El grupo de proteínas que se expresaron en la membrana celular incluía 17 proteínas, de ellas, 11 presentaron expresión en el sistema nervioso. Se realizó un análisis bibliográfico de la función y de los fenotipos mutantes de las proteínas utilizando las bases de datos descritas anteriormente **Tabla R5**. Uno de los genes que codifican para estas proteínas de superficie se asocia con enfermedades humanas: *Solute carrier family 16 member 1 (SLC16A1)* relacionado con hipoglucemia hiperinsulinemia familiar 7 (entrada de OMIM: [600682](#)). Además, una proteína había sido relacionada como autoantígeno patogénico candidato de otra enfermedad: *Selenium-binding protein 1* en el síndrome de Behçet. Al no existir ningún fenotipo mutante similar al fenotipo del SOM, se desechó la posibilidad de que alguna de estas proteínas fuese un autoantígeno candidato en la enfermedad objeto de estudio. Además no se aislaron proteínas comunes por casos con SOM en adultos o en niños con neuroblastoma.

**Tabla R5.** Información funcional y fenotipos mutantes de las proteínas inmunoprecipitadas por sueros de pacientes adultos con SOM idiopático.

Proteína	Gen	Función celular	Expresión	Enfermedad asociada (OMIM)	Modelo animal KO (MGI)
<i>A-kinase anchor protein 12</i>	<i>AKAP12</i>	Proteína de anclaje que media la compartimentalización de la protein kinasa A y protein kinasa C	Células endoteliales, fibroblastos y osteosarcoma	No ( <a href="#">604698</a> )	N/D <a href="#">MGI:1932576</a> Susceptibilidad a transformación oncogénica de la próstata de ratones [315]
<i>CaM Kinase-like vesicle-associated protein</i>	<i>CAMKV</i>	No tiene función kinasa <i>in vitro</i> .	Cerebro y debilmente en el ojo	No ( <a href="#">614993</a> )	N/D <a href="#">MGI:2384296</a>
<i>cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta</i>	<i>PRKACB</i>	Media la señalización dependiente de AMPc de los receptores acoplados a proteína G	Isoforma 1 más abundante en cerebro. Isoforma 2 timo, bazo y riñón. Isoforma 3 y 4 solo en cerebro	No ( <a href="#">176892</a> )	N/D <a href="#">MGI:97594</a> No es esencial para la función neuronal ni desarrollo de ratones [316]
<i>DNAJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial</i>	<i>DNAJA3</i>	Modula la transducción de señales apoptóticas	Corazón, hígado, pulmón y músculo esquelético.	No ( <a href="#">608382</a> )	El ratón con la proteína mutada presenta cardiomiopatías, e hipoactividad <a href="#">MGI:1933786</a>
<i>G-protein coupled receptor family group 5 member D</i>	<i>GPRC5D</i>	Receptor acoplado a proteína G	Páncreas, riñón, intestino delgado, bazo y testículos. No detectable en cerebro.	No ( <a href="#">607437</a> )	Ratón KO número de plaquetas anormales <a href="#">MGI:1935037</a>
<i>Leucine-rich repeat-containing protein 15</i>	<i>LRRC15</i>	Unión de colágeno, fibronectina y laminina	Cerebro y placenta	N/D	Ratón KO alteración en el metabolismo de glucosa <a href="#">MGI:1921738</a>
<i>Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2 isoform X2</i>	<i>GP2</i>	Proteína de anclaje lipídico en la membrana de los gránulos de células acinares pancreáticas	Gránulos pancreáticos	No ( <a href="#">602977</a> )	Ratón KO sin signos de mala-absorción de nutrientes. Los gránulos pancreáticos son normales. [317].
<i>Protein dispatched homolog 2</i>	<i>DISP2</i>	Señalización molecular	Tejidos linfoides, células hematopoiéticas, cortex cerebral, cerebelo	No ( <a href="#">607503</a> )	N/D <a href="#">MGI:2388733</a> . Disp1 pero no Disp2 es esencial para el patrón de señalización de Sonic hedgehog durante el desarrollo de embriones de ratón. [318]

Proteína	Gen	Función celular	Expresión	Enfermedad asociada (OMIM)	Modelo animal KO (MGI)
<i>Phospholipid phosphatase 3</i>	<i>PLPP3</i>	Cataliza la conversión del ácido fosfatídico en diacilglicerol	Ubícuca	No ( <a href="#">607125</a> )	Ratones con la proteína mutada presentaban vasculogenesis anormal, hemorragia <a href="#">MGI:1915166</a>
<i>Protein NipSnap homolog 2</i>	<i>GBAS</i>	Unión de proteínas	Ubícuca	No ( <a href="#">603004</a> )	N/D <a href="#">MGI:1278343</a>
<i>Protein UNC-13 homolog A</i>	<i>UNC13A</i>	Maduración de vesículas durante la exocitosis. Relacionada con la liberación de neurotransmisores	Localizada en la zona activa de la densidad presináptica	No ( <a href="#">609894</a> )	N/D <a href="#">MGI:3051532</a> . La deficiencia de la proteína en cultivos organotípicos de cerebro de ratón compromete la secreción del precursor de la proteína amiloide (APP) [319]
<i>Selenium-binding protein 1</i>	<i>SELENB P1</i>	Sensor de xenobioticos	Pulmón, hígado, colon, próstata, riñón y páncreas. También en cerebro	Autoantígeno candidato en la patogénesis de uveitis en pacientes con enfermedad de Behçet ( <a href="#">604188</a> )	Ratón KO sin alteración del fenotipo <a href="#">MGI:96825</a>
<i>Serine/threonine-protein kinase MRCK beta</i>	<i>CDC42B</i>	Regulación de la organización del citoesqueleto via fosforilación de PP1R12C	Ubícuca	No ( <a href="#">614062</a> )	N/D <a href="#">MGI:2136459</a>
<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3</i>	<i>ATP1B3</i>	Componente no catalítico del enzima que cataliza la hidrólisis del ATP	Ubícuca	No ( <a href="#">601867</a> )	N/D <a href="#">MGI:107788</a> . Knockdown siRNA <i>in vivo</i> modifica la sensibilidad nociceptiva en ratones[320]
<i>Solute carrier family 16 member 1</i>	<i>SLC16A</i>	Cataliza el transporte en la membrana de cuerpos cetónicos.Contribuye en la secreción de insulina	Ubícuca	Defecto en el transporte del lactato en los eritrocitos Hipoglucemia hiperinsulinemia familiar, 7 ( <a href="#">600682</a> )	N/D <a href="#">MGI:106013</a>
<i>Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3</i>	<i>SLC2A3</i>	Transporte de glucosa facilitado	Ubícuca	No ( <a href="#">138170</a> )	N/D <a href="#">MGI:95757</a> . Alteración del transporte placentario de glucosa en ratones en heterocigosis [321] Ratón KO con incremento en los niveles de potasio circulante, alteración del electrocardiograma (intervalo RR y segmento ST corto) <a href="#">MGI:3642995</a>
<i>V-set and immunoglobulin-domain-containing protein 8</i>	<i>VSIG8</i>	Unión de poli (A) RNA	Ubícuca	N/D	

Abreviaturas utilizadas: N/D, información no disponible; OMIM, *Online mendelian inheritance man database*; MGI, identificador de fenotipos KO de *Mouse genome database* (MGD) disponible en [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org).

## **1. Reactividad de los sueros de pacientes con NMT.**

La información clínica completa de los pacientes con hiperexcitabilidad de nervio periférico o NMT incluidos en el estudio ha sido previamente publicada [227].

Brevemente, los pacientes (con una media de edad de debut de los síntomas de 40 años) presentaban mioquimias y calambres. Ocho pacientes tenían hipertrofia muscular, tres pacientes tenían cáncer (timoma) diagnosticado entre los cinco primeros años del diagnóstico de hiperexcitabilidad y un paciente presentaba además una axonopatía con MGUS de IgM.

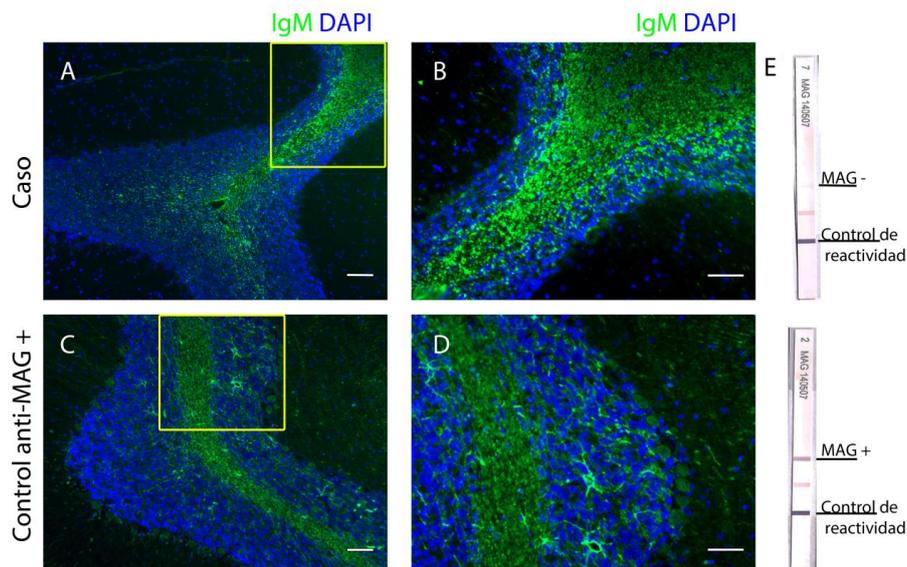
Con el objetivo de comprobar la naturaleza autoinmune de los sueros de pacientes con NMT, que incluiríamos en los experimentos de inmunoprecipitación, se realizaron estudios de inmunofluorescencia sobre secciones sagitales de cerebro y cerebelo de rata Wistar y sobre las uniones neuromusculares del músculo diafragma de ratón C57BL/6J.

### **1.1 Inmunofluorescencias sobre secciones sagitales de cerebro y cerebelo de rata.**

Se estudió la reactividad de IgG e IgM de los sueros de los pacientes con NMT, frente a secciones sagitales de 7µm de cerebro/cerebelo de rata Wistar fijado por inmersión con PFA durante 1h. No se observó ningún tipo de reactividad específica de IgG en pacientes con NMT (con o sin cáncer): 2/38 (5%) tiñeron los núcleos (pacientes con anticuerpos anti-ANA positivos o anticuerpos anti-SSA [Ro] positivos por inmunoblot), 2/38 (5%) tiñeron la capa molecular del cerebelo de forma difusa, 1/38 (2%) reaccionó con la capa granular del cerebelo y 1/38 (2%) reaccionó con el citoplasma de las células de Purkinje.

Se observó una ligera reactividad de IgM frente a la sustancia blanca en 11/38 (29%) pacientes. Esta tinción era similar a la de los axones de la capa molecular con anti-

neurofilamento. Se utilizaron controles de individuos sanos sin NMT (n=71, media edad 61+/-9 años) para comprobar si la reactividad observada en los pacientes con NMT aparecía también en individuos sanos. En los controles se observó una tinción de IgM semejante a la de los pacientes con NMT: una reactividad frente a la sustancia blanca tipo neurofilamento en 10/71 (14%) y una tinción nuclear positiva tenue en 2/71 (3%). El paciente con NMT, neuropatía axonal con MGUS de IgM, a diferencia de los controles negativos, presentó una intensa reactividad de IgM frente a la sustancia blanca y un punteado en la capa granular del cerebelo que no aparecía en los otros casos. En este caso, la tinción de la sustancia blanca era muy parecida a la reactividad del antígeno glicoproteína asociada a mielina (MAG). Debido a que el 50% de los pacientes con MGUS y neuropatía axonal tienen anticuerpos anti-MAG, se realizó un inmunoblot para detectar anticuerpos IgM dirigidos frente a MAG. Sin embargo, el paciente resultó negativo para anticuerpos IgM anti-MAG, véase la **Figura R12**.



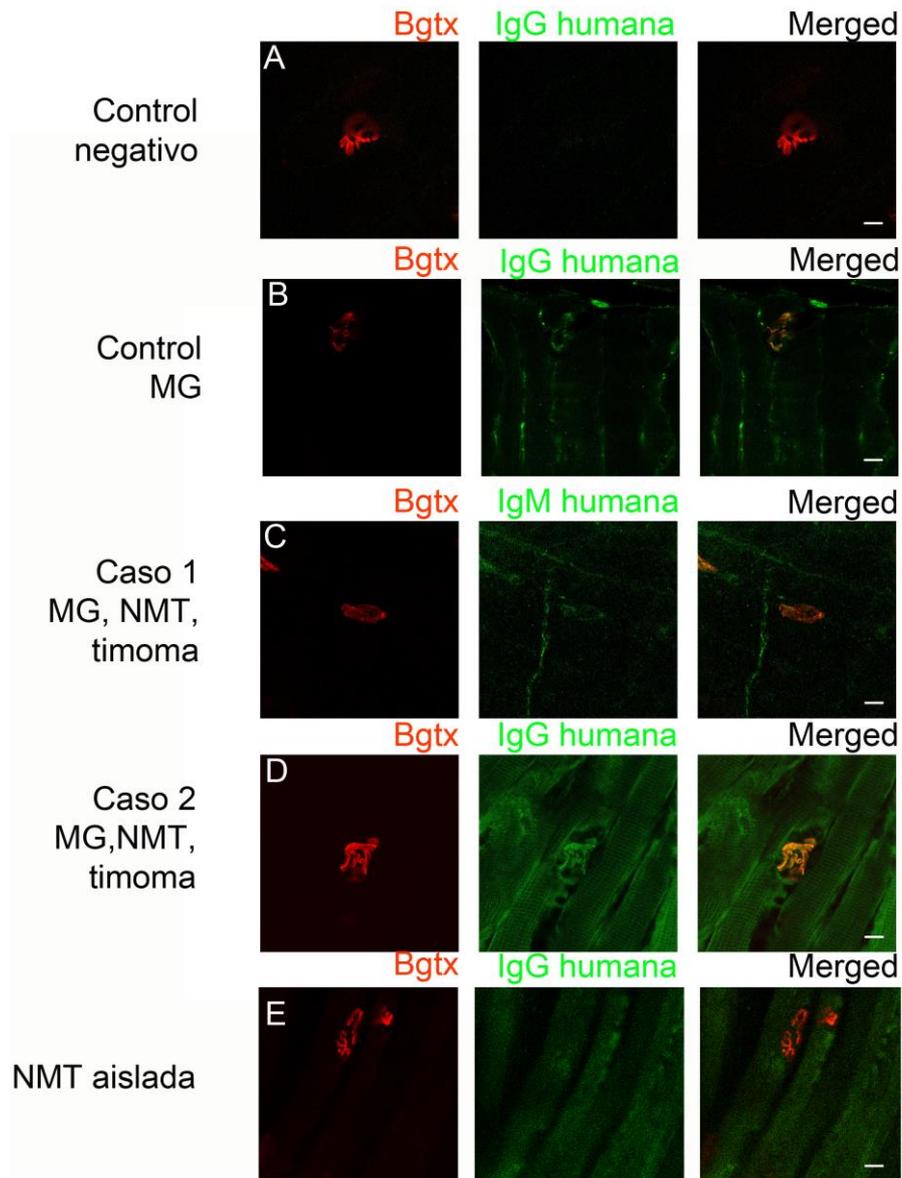
**Figura R12.- Inmunofluorescencia y dot-blot de IgM anti-MAG del paciente con hiperexcitabilidad periférica y MGUS.** El paciente con hiperexcitabilidad de nervio periférico y MGUS de IgM (Caso) tenía una reactividad de IgM similar a MAG pero no tenía anticuerpos frente a esta proteína. (A-B) Inmunoreactividad de IgM del suero del paciente sobre sección sagital de cerebelo de rata; (C-D) Inmunoreactividad de IgM del suero de un paciente con anticuerpos anti-MAG positivos sobre sección sagital de cerebelo de rata; (E) Dot-blot para la detección de anticuerpos IgM frente a MAG. Barra de escala: 50µm.

## 1.2 Inmunofluorescencias sobre uniones neuromusculares de ratón.

Para comprobar la hipótesis de que los pacientes con NMT tenían anticuerpos frente a antígenos de superficie de la terminal presináptica de la unión neuromuscular, se realizaron inmunofluorescencias de IgG e IgM con los sueros de pacientes con NMT frente a fragmentos de diafragma de ratón C57BL/6J (para marcar las uniones neuromusculares el tejido se incubó con bungarotoxina conjugada con rodamina).

Se determinaron los patrones de inmunofluorescencia contra la unión neuromuscular, utilizando sueros de pacientes con MG seropositiva (con anticuerpos anti-AChR positivos) e individuos sanos, como controles negativos. Los sueros con anticuerpos anti-AChR positivos mostraron reactividad contra la unión neuromuscular y ninguno de los sueros control resultó inmunorreactivo frente a la unión neuromuscular de forma significativa.

De los 15 sueros con MG y NMT que previamente mostraron reactividad, ocho (53%) mostraron reactividad de IgG frente a la unión neuromuscular y dos (14%) mostraron reactividad de IgM frente a la unión neuromuscular. El resto de pacientes, incluyendo los pacientes con NMT aislada, no mostraron una reactividad diferente a la de los controles negativos **Figura R13**.



**Figura R13.- Inmunoreactividad sobre la unión neuromuscular de los sueros de pacientes con NMT.** Imágenes de microscopía confocal representativas de la reactividad frente a la unión neuromuscular de los sueros con NMT. Los sueros de controles sanos (**Control negativo**) no mostraron reactividad frente a la unión neuromuscular, mientras que los controles con MG (**Control MG**) mostraron una reactividad que colocalizaba con la unión neuromuscular marcada con bungarotoxina. De los pacientes con MG y NMT 8/15 mostraron una reactividad de IgG similar a los controles positivos (**Caso 2** de la Tabla R9), y 2/15 mostraron una ligera reactividad de IgM (**Caso 1** de la Tabla R9). Los pacientes con NMT aislada no mostraron reactividad en la unión neuromuscular (**NMT aislada**). Nótese también como algunos pacientes con NMT mostraron una reactividad de IgG frente al músculo estriado (Caso 2 y NMT aislada). Barra de escala: 10µm

## **2. Inmunoprecipitaciones con sueros de pacientes con NMT.**

En los estudios de inmunoprecipitación se incluyeron los sueros de: tres pacientes con NMT, MG y timoma, tres pacientes con NMT aislada y un paciente con MGUS de IgM (Véase la **Figura M1**). Al igual que sucedió con los casos de SOM, tras separar las proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida Bis-Tris 4-12% en condiciones MOPS y teñir los geles con Azul Coomassie, tampoco había ninguna banda de proteínas diferencial. Por tanto, se secuenciaron las calles de proteínas completas por espectrometría LC-MS/MS y se seleccionaron aquellas proteínas identificadas en los archivos generados por el ProteinPilot con un Unscored >1.3 (coeficiente de confianza de la identificación >95%). Nuevamente, la información de la abundancia de las proteínas se utilizó únicamente para comparar casos y controles y preseleccionar las proteínas de interés, tal y como se ha descrito anteriormente (Véase la **Tabla R1**).

### **2.1 Proteínas inmunoprecipitadas por los sueros de pacientes con NMT.**

Los sueros de pacientes con NMT identificaron un total de 184 proteínas, de las cuales se eliminaron: (1) 139 proteínas inmunoprecipitadas con los controles (pacientes con SOM, encefalitis con anti-IgLON5 o individuos sanos) y (2) 22 proteínas no específicas o consideradas posibles contaminaciones (Igs, proteínas de la piel o plasma, proteínas sin equivalencia humana). Puede verse un diagrama de los experimentos realizados con los sueros de pacientes con NMT en la **Figura R14**.

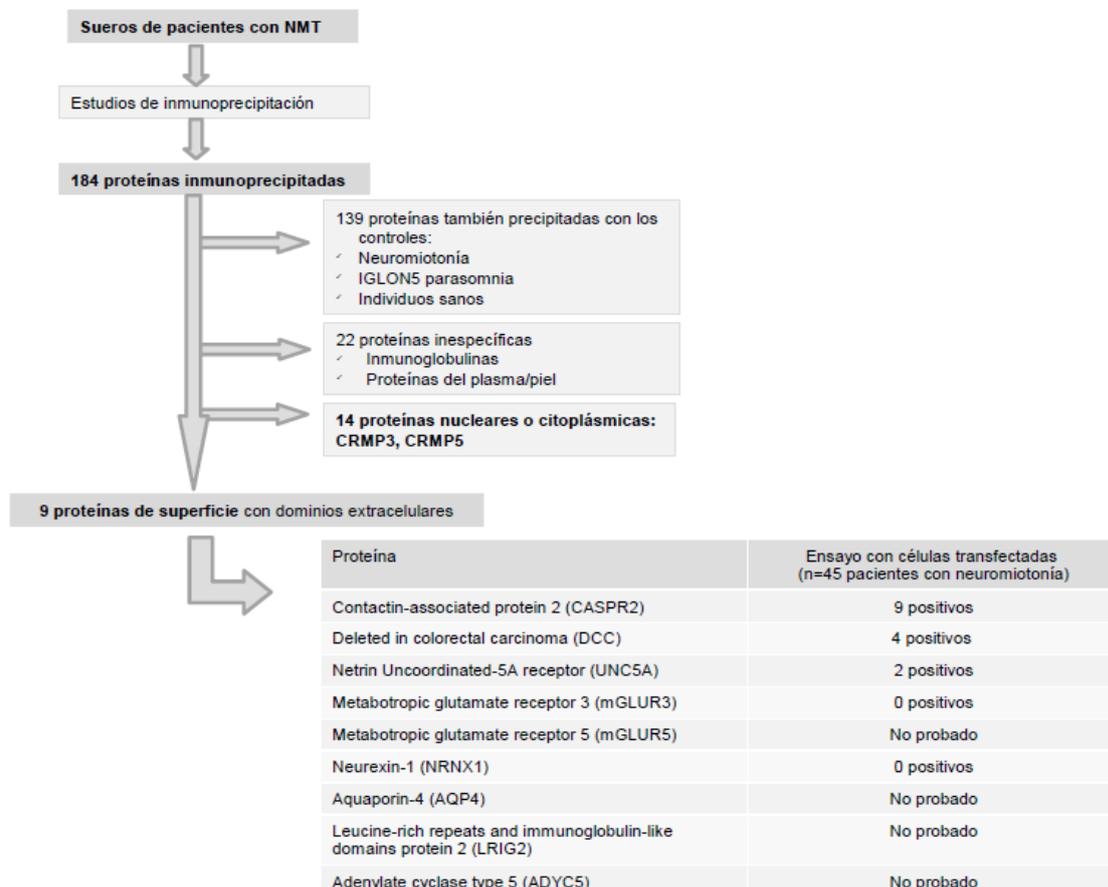


Figura R14. Diagrama de flujo de los experimentos realizados con sueros de pacientes con NMT.

### 2.1.1 Análisis funcional y bibliográfico de fenotipos mutantes de las proteínas de superficie inmunoprecipitadas por los sueros de pacientes con NMT.

Se realizó un análisis bibliográfico de la localización subcelular de las proteínas identificadas utilizando la base de datos *universal protein resource* (disponible en [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). De las 23 proteínas que se seleccionaron (Véase la **Tabla R6**), 14 de ellas tenían una localización intracelular (citoplásmica o nuclear) y nueve eran proteínas de superficie. El grupo de proteínas intracelulares incluía una proteína relacionada con encefalitis paraneoplásica: *collapsin response-mediator protein 5* (CRMP5 o CV2) [322, 323]. El análisis funcional y de los fenotipos KO de las proteínas puede verse en la **Tabla R7**.

**Tabla R6.** *Proteínas inmunoprecipitadas con el suero de pacientes con NMT, MG y timoma.* Se resaltan las proteínas de membrana.

Proteína	Gen	Código NCBI	Localización subcelular	Unused Total	Sustrato
<i>60S ribosomal protein L18</i>	<i>RPL18</i>	gi 89573867	Citoplasma	3.34, 1.47	SC
<i>Adenylate cyclase type 5</i>	<i>ADCY5</i>	gi 149060612	Membrana, cilios	1.74	SC
<i>Aquaporin-4</i>	<i>AQP4</i>	gi 6978531	Membrana	2.06	SC
<i>Capping protein (actin filament) muscle Z-line</i>	<i>N/A</i>	gi 149065041	Citoplasma	1.44, 2.01, 2	SC
<i>Choline O-acetyltransferase</i>	<i>CHAT</i>	gi 282154809	Citoplasma, núcleo	14.29	SC
<i>Collapsin response mediator protein 3</i>	<i>CRMP3</i>	gi 3122037	Citoplasma	10.97, 1.57	SC
<i>Collapsin response mediator protein 5</i>	<i>CRMP5</i>	gi 6714522	Citoplasma, dendritas	16.77	SC
<i>Contactin-associated protein-like 2</i>	<i>CASPR2</i>	gi 7662350	Membrana, axón	4.86	SC
<i>Deleted in colorectal carcinoma</i>	<i>DCC</i>	gi 149064590	Membrana	10.12	SC
<i>Furry-like protein</i>	<i>FRY</i>	gi 189342174	Citoplasma	52.85	SC
<i>Golgin subfamily A member 3</i>	<i>GOLGA3</i>	gi 157822655	Aparato de Golgi	31.88	SC
<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 2</i>	<i>LRIG2</i>	gi 68299752	Membrana, citoplasma	2	SC
<i>Malonyl-CoA decarboxylase</i>	<i>MLYCD</i>	gi 67460103	Citoplasma, matriz mitocondrial y peroxisomas	2.24	SC
<i>Metabotropic glutamate receptor 3</i>	<i>GRM3</i>	gi 157787068	Membrana	3.14	SC
<i>Metabotropic glutamate receptor 5</i>	<i>GRM5</i>	gi 8393490	Membrana	8.26	SC
<i>Netrin receptor UNC5A precursor</i>	<i>UNC5A</i>	gi 11559980	Membrana, balsa lipídica, proyecciones celulares	21.62	SC
<i>Neurexin-1</i>	<i>NRXN1</i>	gi 37620151	Membrana, unión entre células	8.78	SC
<i>Neurocan core protein</i>	<i>NCAN</i>	gi 404312657	Matriz extracelular	17.37	SC
<i>Phospholipase C, beta 1</i>	<i>PLCB1</i>	gi 149023393	Núcleo, citoplasma	1.41	SC
<i>Protein furry homolog-like</i>	<i>FRYL</i>	gi 293341689	Corteza celular	3.08	SC
<i>Septin 7</i>	<i>SEPT7</i>	gi 9789715	Citoesqueleto	1.31	SC
<i>Serine/threonine-protein kinase MRCK</i>	<i>CDC42BP A</i>	gi 16758474	Citoplasma	4.01	SC
<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 16</i>	<i>VPS16</i>	gi 53850610	Membrana lisosomal	1.8	SC

Abreviaturas utilizadas: SC, sinaptosomas crudos.

**Tabla R7.** Información funcional y fenotipos mutantes de las proteínas de superficie inmunoprecipitadas por sueros de pacientes con NMT.

Proteína	Gen	Función celular	Expresión	Enfermedad asociada (OMIM)	Modelo animal KO (MGD)
<i>Adenylate cyclase type 5</i>	<i>ADCY5</i>	Cataliza la formación de AMPc en el proceso de señalización de proteína G.	Islotes pancreáticos	Disquinesia, familiar, con mioquimia facial ( <a href="#">600293</a> )	N/D ( <a href="#">MGI:99673</a> )
<i>Aquaporin-4</i>	<i>AQP4</i>	Canal específico para el agua. Osmoreceptor, regula el balance hídrico en el SNC.	Astroцитos perivasculares. Músculo esquelético.	No ( <a href="#">600308</a> )	N/D ( <a href="#">MGI:107387</a> ) Función retinal anormal y trastornos de audición en ratones KO [324, 325]
<i>Contactin-associated protein-like 2</i>	<i>CASPR2</i>	Formación de dominios funcionales para la conducción de impulsos nerviosos en axones mielinizados.	Sistema nervioso. Región juxtapanodal de uniones axo-gliales.	Síndrome de epilepsia focal y displasia cortical. ( <a href="#">604569</a> )	N/D <a href="#">MGI:1914047</a>
<i>Deleted in colorectal carcinoma</i>	<i>DCC</i>	Receptor de netrina necesario para la guía axonal.	Axones y células diferenciadas del intestino.	Cáncer colorectal y carcinoma de esófago (somático). Movimientos espejo 1 ( <a href="#">120470</a> )	Muerte prenatal ( <a href="#">MGI:94869</a> ). Modificación de la organización de la médula espinal que afecta a la coordinación durante la locomoción [326]
<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 2</i>	<i>LRIG2</i>	Regulador de receptores de factores de crecimiento. [327]	Ubicua	Síndrome urofacial 2 ( <a href="#">608869</a> )	N/D <a href="#">MGI:2443718</a>
<i>Metabotropic glutamate receptor 3</i>	<i>GRM3</i>	Receptor de glutamato acoplado a proteína G	Córtex cerebral, talamo, hipotálamo, hipocampo, cuerpo caloso, núcleo caudado y amígdala.	No ( <a href="#">601115</a> )	Trastornos en la coordinación motora en ratones GRM2/3 (-/-), el defecto es menor en los mutantes GRM3 [328]
<i>Metabotropic glutamate receptor 5</i>	<i>GRM5</i>	Receptor de glutamato acoplado a proteína G. Posible implicación en proceso de memoria y aprendizaje.	Amplia distribución en neuronas del sistema nervioso	No ( <a href="#">604102</a> )	N/D <a href="#">MGI:1351342</a>
<i>Netrin receptor UNC5A</i>	<i>UNC5A</i>	Receptor de netrina, guía de axones.	Subpoblaciones de motoneuronas.	No ( <a href="#">607869</a> )	N/D <a href="#">MGI:894682</a> Incrementa neuronas en la médula espinal
<i>Neurexin-1</i>	<i>NRXN1</i>	Exocitosis de gránulos y regulación de la transmisión de la señal.	Cerebro	Susceptibilidad a esquizofrenia 17. Síndrome de Pitt-Hopkins 2 ( <a href="#">600565</a> )	Temblores, disminución de fuerza de agarre, alteración locomotora, disminución de la tasa respiratoria. <a href="#">MGI:1096391</a>

Abreviaturas utilizadas: N/D, información no disponible; OMIM, *Online mendelian inheritance man database*; MGI, identificador de fenotipos KO de *Mouse genome database* (MGD) disponible en [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org).

### **3. Inmunofluorescencias sobre células HEK293T transfectadas con los candidatos antigénicos.**

De entre las nueve proteínas de superficie, dos proteínas habían sido previamente relacionadas con enfermedades neurológicas autoinmunes: AQP4 en pacientes con neuromielitis óptica [329] y *metabotropic glutamate receptor 5* (mGluR5) en pacientes con Linfoma de Hodgkin y encefalopatía límbica (Síndrome de Ofelia) [330]. Las mutaciones en los genes que codifican para las restantes proteínas se relacionan con trastornos del movimiento o defectos en la organización de la médula espinal que afectaban a la coordinación motora. Se comprobó la antigenicidad con células HEK transfectadas para expresar las siguientes proteínas: *contactin-associated protein-like 2* (Caspr2); dos receptores de netrina-1: *deleted in colorectal carcinoma* (DCC), *uncoordinated-5 homolog A netrin receptor* (UNC5A); *metabotropic glutamate receptor 3* (mGluR3) y *neurexin-1* (Nrxn1).

#### **3.1 Asociaciones clínicas en los pacientes seropositivos.**

Las células HEK293T transfectadas con los antígenos de interés (Caspr2, DCC, UNC5A, Nrxn1 y mGluR3) se incubaron con los sueros de 45 pacientes con NMT. Algunos pacientes presentaron anticuerpos contra Caspr2, DCC o UNC5A, pero no contra Nrxn1 o mGluR3. La secuencia de los péptidos identificados y la cobertura de los antígenos identificados pueden verse en la **Figura R15**. Se amplió el estudio de estas proteínas incubándolas con el suero de 98 pacientes y 219 controles. Los resultados se recogen en la **Tabla R8**.

Proteína	Unused	Cobertura (%)	Código NCBI	Secuencias peptídicas	Especie
<i>Contactin-associated protein-like 2</i>	3.33	4.8%	gi 7662350	DAGFLSYKDHLVPSQVVVGDTRQGSEAK, VQFNHIAPLK, VIETGKIDQEIHKYNTPGFTGCLSR.	<i>Homo sapiens</i>
<i>Deleted in colorectal carcinoma</i>	10.12	11.7%	gi 6978755	GNIQTFVFFSR, GVGPLSDPILFR, HHKPDEGLYQCEASLGDSGSIISR, VVVLPAGALQISR, NGDVVIPSDFYQIVGGSNLR, DVVPLVSSR, ILSDPGLHR, VMVAGPLR,FLAYNR, DLTVTR, HGDGGYWPVDTNLIDR.	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Netrin receptor UNC5A</i>	1.59	21.2%	gi 11559980	STDSSSGLPTMEVR, FALVGEALSVAATKR, FQLSNGHLLSPLGSGR, GTSNMAYGTFFNLGGR, HTLHSSPTSEAEDFVSR, IPFLIR,KKEGLSDVADSSILTSGFQPVSIKPSK, LMIPNTGISLIPDAIPR, LSIHDVPSSSLWK, NKPVLLVCK, QLGGQLIQEPR, QVDHVIER, VYCLHDTHDALKEVVQLEK.	<i>Rattus norvegicus</i>

### Contactin-associated protein-like 2

mqaapragcg aalllwivss clcrawtaps tsqkcdelpv sglphvafss sssisgsysp gyakinkrgg aggwpspsds  
hyqwlqvdfg nrkqisaiat qgrysssdw tqyrmlsdt grnwkpyhqdn gnwafpgni nsdgvvrhel qhpiaryvr  
ivpldwnggeg riglrievyg csywadvinf dghvvlpyrf rnkkmktlkd vialnftkse segvilhgeg qggdyitlel  
kkaklvlsln lgsnqlgpiy ghtsvmtgsl lddhhwhsvv ierqgrsinl tldrsmqhfr tngefdylld dyeitfggip  
fsgkpssssr knfkgcmesi nyingvntdl arrkklepn vgnlsfscve pytvpvffna tsylevpgrl nqdlfsvsfq  
frtwnpngll vfishfadnlg nveidltesk vgvhinitqt kmsqidissg sglndggqwe vrlakenfa iltidgdeas  
avrtnsplqv ktgekyffgg flnqmnssh svlqpsfggc mqliqvddql vnlyevaqrk pgsfanvsid mcaiidrcvp  
nhcehgkcs qtwdsfkctc detgysgatc hnsiypsce aykhlqgtsn yywidpdgsg plgplkvyen mtedkvwtiv  
shdlqmqtpv vgnpekyysv tqlvysasm qisaitdsae yceqyvsyfc kmsrllntpd gspytwwvgk anekhywwg  
sgpgiqkacac giernctdpk yycncdadyk qwrkdagfls ykdhlpvsvq vvgdtdrqqg leaklsvqplr cggdrnywna  
asfnpnssyl hfstfqqets adisyfktl tpwgvfleml gkedfiklel ksatevsfsf dvngngpveiv vrsptplndd  
qwhrvtaern vkqaslqvdr lpqqirkapt eghtrelyls qlfvggaggq qgflgcirsl rmngvtldle erakvtsqgi  
sgcsghtcsy gtncenggkc leryhgygcd csntaydgtf cnkdvgaffe egmwlrynfq apatnards srvdnadpqq  
nshpdlaqee irfsfsttka pcillyissf ttdflavlvk ptgslqiryng lggtrepyini dvdhrnmang qphsvnitrh  
ektiflklhd ypsvsihpls ssdtlfnspk slflgkviet gkidqeiiky ntpgftgcls rvqfnqapl kaalrqtnas  
ahvhiqgelv esncgasplt lspmssatdp whldhldsas adfpyngggq qairngvnrn saiggviav viftilctlv  
fliryfmrhk gtyhtneakg aesaesadaa imndpnfte tideskkewl i

### Deleted in colorectal carcinoma

menslgcvvw pklafvlfga slsahlqvt gfqikpftsl hfvsepsdav tmrggnvlln csaesdrqvp vikwkkgdli  
lalqmdrrkq qlpngslliq nilhsrhhkp deglyqceas lgdsqsiisr takvmvagpl rflsqtesit afmqdvtllk  
cevigdpmpit ihwqknqqdl npipgdsrvv vlpsgalqis qlqpgdsgvy rcsarnpast rtgneaevri lsdpglhrql  
yflqrpnsvi aiegkdavle ccvsgyppps ftwlrgeevi qlrskkysll ggsnllisnv tdddsgtytc vvtyknenis  
asaeltvlvp pwalnhpsnl yayesmdief ecavsgkppv tvnwmkngdv vipsgdyfgiv ggsnlrlilgv vksdegfyqc  
vaeneagnaq pqaqlivpkp aipsssilps aprdvvpvlv ssrfvrlswr ppaekgniq tftvffsreg dnrreralntt  
qpgslqltvq nlkpeamtyf rvvaynewgp gessqpkiva tqpelqvpvp venlhavsas ptsilitwep payangpvvg  
yrlfctevst gkeqnievdg lsykleglkk fteytlrfla ynryyggvst dditvvtltd vpsappqns levvnrsik  
vswlpppsgt qngfitgyki rhrktrrge metlepnnlw ylfgtlekgys qysfvqsamt vngtgpssnw ytaetpendl  
desqvdpdps slhvrpqtnc iimswtppln pniivryygi gyvgvspyae tvrvdskqry ysierless hyvislkafn  
nagegvplye sattsitdp tdpvdyppll ddfptsqpdv stpmlppvgv qavaltheav rsvwadnsvp knqktsdvr  
ytvwrtsfsf asakyksedt tslytatgl kpnmyefsv mvtknrrsst wsmtahatty eaaptsapk dltvitrgek  
ravivswqpp leangkitay ilfytlkni pidwimet i sgdrllthqim dlsldtmyyf riqarnaqgv gplsdpilfr  
tlkvehpdkm andqgrhgdg gywpvdtl drrstlneppi gqmhpghsv tpqknsnllv itvvtvgtl vlvvivavi  
ctrssaaqr kkrathsask rkgsqkdlrp pdlwiheem emkniekpag tdpagrgspi qscqdltpvs hsqsesqmg  
ksashsgqdt eeagssmstl erslaarrat rtklmipmea qsnnpavvsa ipvptlesaq ypgilpsct gyphqftlr  
pvpfptlsvd rgfgagrvtv egptaqqpm lppaqpehps seeaprtip tacvrpthpl rsfanpllp pmsaiepkvp  
ytpllsqpgp tlpkthvcta siglagkars pllpvsvpta pevseeahk tedpasvyeq ddlseqmasl eglmkqlnai  
tgsaf

### Netrin receptor UNC5A

mavrpplwv llgivilaawl rgsgaqqsat vanvpvganp dllphflvep edvyivknkp yllvckavpa tqiffkcnge  
wvrgvdhvie rstdsssglp tmevrinvsr qqvekvfgle eywqcqvaws ssgttskqka yiraiaylrn feqeplakev  
sleqqivlpc rpegiappae vewlrnedlv dpsldpnvyi trehslvvrq arladyant cvaknivarr rstaavivy  
vnggwstwe svscasagr gwqkrsrcet npaplngaf cegqnvqkta catlcqvds wsswskwac rldcthrsr  
ecsdpaprng geecrgadld trnctsdcl htascpedva lyiglvavav clfllllalq liycrkkegl dsdvdadssil  
tsgfqpvsik pskadnphll tiqpdltstt tyyqgslcsr qdgpsspkfql snghllspig sgrhtlhss ptseaedfvs  
rlstqnyfrs lprgtsnmay gtfnflggrl mipntgisll lppdaiprgk iyeiytlhk pedvrlplag cqtlispvvs  
cgppgvlltr pvilamdhcg epspdswsr lkkqscsegw edvlhlgees pshlyycqle agacyvftq lgrfalvgea  
lsvaatklr lllfapvact sleynirvyc lhdthdalke vvqlekqlgg qliqepvlh fkdshnlrl sihdvpslw  
kskllvsyqe ipfyhiwnqt qyylhctftl erinastsd l ackwvwqve gdgqsfnin nitkdtfrfae llalesegav  
palvgpsafk ipflirgkii asldppcsrg adwrtlaqkl hldshlsffa skpsptamil nlwearhfn gnlqqlaaav  
aglgqpdagl ftvseaec

Figura R15.- Péptidos identificados de las proteínas Caspr2, DCC y UNC5A.

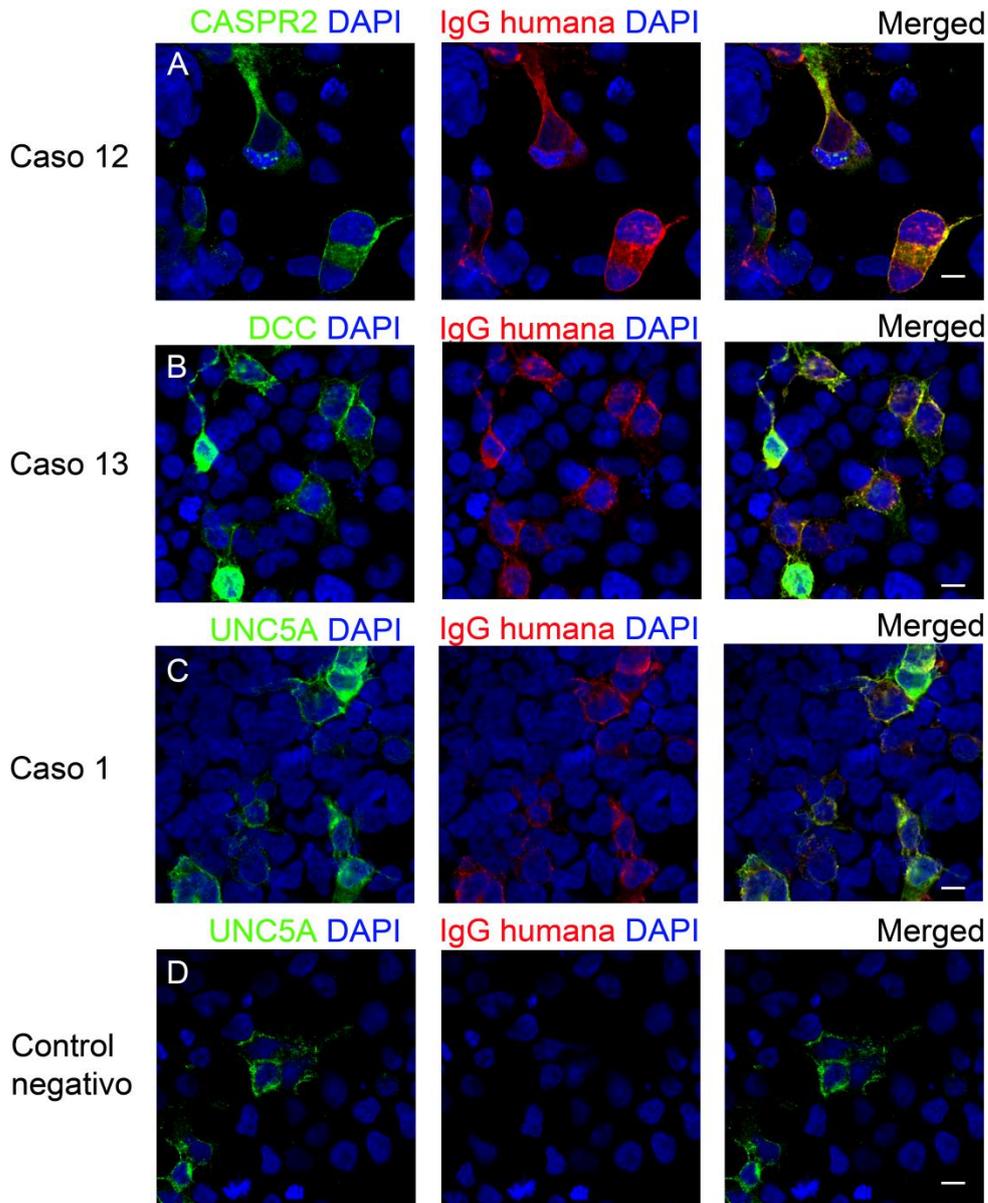
**Tabla R8.** *Pacientes seropositivos por grupo clínico.*

		N	Caspr2	DCC	UNC5A	
<b>Timoma</b> (n=42)	NMT (9 con MG)	10	7	4	2	
	MG	23	1	2	-	
	Sin síntomas neurológicos	9	1	1	-	
<b>Sin timoma</b> (n=275)	NMT + encefalitis límbica+ ataxia cerebelosa subaguda	2	2	-	-	
	NMT	34	1	-	-	
	MG	20	-	-	-	
	Ataxia cerebelosa esporádica	Subaguda	10	-	-	-
		Crónica	39	-	-	-
	Síndromes de desmielinización del SNC	20	1	-	-	
	Síndrome de Guillain-Barré	20	-	-	-	
	Enfermedad de Alzheimer	50	-	-	-	
	Cáncer (Sin síntomas neurológicos)*	30	-	-	-	
	Individuos sanos	50	-	-	-	

Abreviaturas utilizadas: Caspr2, *contactin-associated protein-like 2*; DCC, *deleted in colorectal carcinoma*; NMT, neuromiotonía; MG, miastenia gravis; UNC5A, *uncoordinated-5 homolog A netrin receptor*. \*Incluía 10 pacientes con cáncer de mama, 10 con cáncer de ovario, 10 con cáncer de piel, 4 con cáncer de pulmón, 10 con tumores primarios cerebrales, 5 linfomas y 5 leucemias.

La prevalencia de pacientes con NMT en nuestra muestra era de un 11.6%, de la MG un 13.5% y de pacientes con NMT y MG un 2.8%, mientras que la prevalencia del timoma era de un 13.5%. De los 42 pacientes con timoma, 23 tenían MG, diez tenían timoma sin manifestaciones neurológicas, nueve MG y NMT y uno tenía NMT aislada. La clasificación clínica de Masaoka de los timomas incluidos en nuestra muestra estaba compuesta por subtipos I y IIa que correspondían aproximadamente a la mitad de los pacientes analizados (51.2%), y una proporción también importante en el estadio IVa (30.2%).

En nuestra serie, 15 pacientes (4.7%) tenían, al menos, un anticuerpo positivo. Ocho pacientes (2.5%) eran positivos solo para un anticuerpo y otros siete (2.2%) pacientes eran positivos para dos de ellos. Concretamente, de los 15 pacientes con anticuerpos positivos frente a las proteínas estudiadas: 13 tenían anticuerpos anti-Caspr2 (solo anticuerpos anti-Caspr2 [n=6, 1.9%], con anticuerpos adicionales frente a DCC [n=5, 1.6%] o UNC5A [n=2, 0.6%]) y dos pacientes (0.6%) tenían anticuerpos aislados frente a DCC (Véanse la **Tabla R8** y la **Figura R16**).



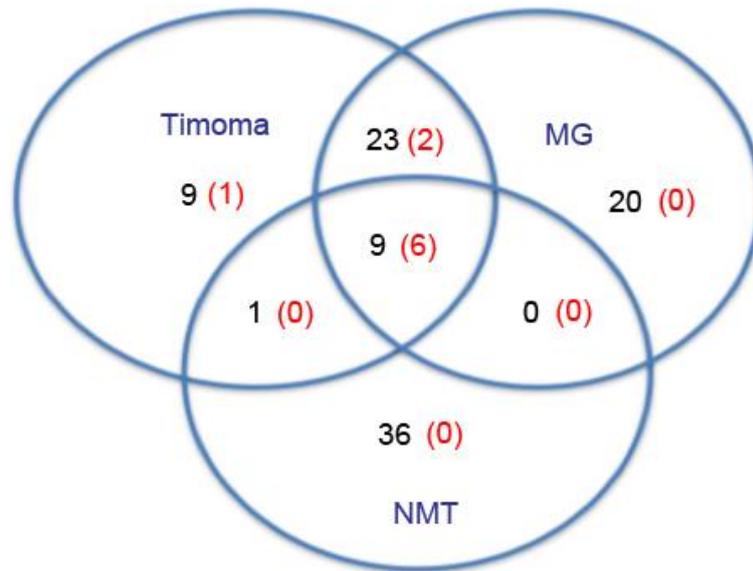
**Figura R16.- Inmunofluorescencia sobre células HEK293T transfectadas con Caspr2, DCC o UNC5A.** Los sueros de pacientes con NMT se incubaron con células HEK293T transfectadas con plásmidos que codificaban para las proteínas humanas Caspr2, DCC o UNC5A. **(A)** Células HEK293T transfectadas con Caspr2 incubadas con un anticuerpo comercial anti-Caspr2 (verde) y con el suero del paciente con NMT #12 de la Tabla R9 (rojo); **(B)** Células HEK293T transfectadas con DCC incubadas con un anticuerpo comercial anti-DCC (verde) incubadas con el suero del paciente con NMT #13 de la Tabla R9 (rojo); **(C)** Células HEK293T transfectadas con UNC5A-GFP (verde) incubadas con el suero del paciente con NMT y timoma #1 de la Tabla R9 (rojo). **(D)** El suero control no mostró reactividad frente a las proteínas transfectadas, en este caso UNC5A. Barra de escala: 20µm.

De entre los pacientes con timoma, 11/42 (26%) tenían anticuerpos frente a Caspr2 o receptores de Netrina-1, mientras que, entre los pacientes sin timoma, solamente 4/275 (1.5%) tenían anticuerpos anti-Caspr2 ( $p < 0.001$ ). Los nueve pacientes con anticuerpos anti-receptores de Netrina-1 tenían un timoma. Además, seis de ellos tenían también NMT, MG e insomnio severo (todos con anticuerpos anti-receptores de Netrina-1 más anticuerpos anti-Caspr2). La MG con timoma estaba precedida entre uno y diez años de síntomas de desarrollo de hiperexcitabilidad de nervio periférico en cuatro de los pacientes de este grupo y en dos de los pacientes se manifestaron simultáneamente. Los tres pacientes restantes con anticuerpos anti-receptores de Netrina-1 y timoma eran: dos pacientes con MG aislada y uno sin síntomas neurológicos. Por otro lado, los cuatro pacientes sin timoma seropositivos exclusivamente para Caspr2 (ninguno para DCC o UNC5A) incluían: un paciente con NMT severa, encefalitis límbica y parálisis bulbar, un paciente con un síndrome de fasciculaciones y calambres con descargas neuromiotónicas aisladas en los estudios EMG, un paciente con ataxia subaguda y encefalitis límbica (después el paciente desarrolló fasciculaciones en el tronco y descargas neuromiotónicas en los estudios EMG), y una mujer con episodios recurrentes de mielitis y enfermedad celíaca. Las características clínicas de todos los pacientes seropositivos de la serie que se estudiaron se detallan en la **Tabla R9** y la **Figura R17**.

**Tabla R9.** Características clínicas de los pacientes con anticuerpos anti-Caspr2, DCC o UNC5A.

Paciente	Edad/ Sexo	NMT	MG (MGFA)	Síntomas SNC	Timoma (Estadio Masaoka)	Anticuerpos	Terapias inmunomoduladoras	Seguimiento/Desenlace
1*	74/M	Severa generalizada	Generalizada (IIIa) Anti-AchR	Insomnio (Morvan)	Si (IVa)	Caspr2, Unc5a	PLEX, esteroides, azatioprina	19 años / muerte por invasión local de timoma
2	74/M	Leve	Bulbar (IIIb) Anti-AchR	Meningitis aséptica	Si (IIa)	Caspr2, DCC	Esteroides, azatioprina	3 años / minimamente sintomático
3&	48/M	Severa generalizada	Generalizada (IIIa) Anti-AchR	Insomnio (Morvan)	Si (IVa)	Caspr2, DCC	Esteroides, IVIg, PLEX, Rituximab	5 años / minimamente sintomático
4&	41/M	Severa generalizada	Severa bulbar (V) Anti-AchR	Insomnio (Morvan)	Si (IVa)	Caspr2, DCC	Micofenolato, IVIg, esteroides, Rituximab	1 año / minimamente sintomático
5	61/M	Severa generalizada	Ocular (I) Anti-AchR	Insomnio (Morvan)	Si (IVa)	Caspr2, DCC	Esteroides?	8 años / minimamente sintomático
<b>Timoma</b> 6&	29/M	Severa generalizada	Ocular (I) Anti-AchR	Insomnio (Morvan)	Si (IVa)	Caspr2, Unc5a	IVIg, PLEX, Rituximab	1 año/minimamente sintomático
7	43/F	Severa generalizada	-	Insomnio Convulsiones	Si (IVa)	Caspr2	Corticoesteroides Citoreducción timoma	4 años / mínimamente sintomático
8	54/F	-	Severa bulbar (IVb) Anti-AchR	Postura distónica	Si (IVa)	Caspr2, DCC	Esteroides, IVIg/PLEX, micofenolato, ciclosporina, ciclofosfamida	11 años /muerte por invasión local de timoma
9	55/M	-	Generalizada (IIIa) Anti-AchR	-	Si (IIb)	DCC	IVIg, prednisona, azatioprina	7 años/asintomático
10	54/M	-	-	-	Si (I)	DCC	-	1 año/ asintomático
11	75/M	-	-	Temblores	Si (IIa)	Caspr2	-	2 años/asintomático
<b>No timoma</b> 12*	60/M	Severa generalizada, evolucionó a predominantemente bulbar y axonopatía motora rápidamente progresiva.	-	EL, ataxia leve	-	Caspr2	IVIg/Esteroides	6 años/ muerte por debilidad bulbar
13	40/F	Si, síndrome de fasciculaciones y calambres moderado	-	-	-	Caspr2	-	10 años/ minimamente sintomático
14 #	59/M	Leve	-	EL, ataxia cerebelosa	-	Caspr2	IVIg, ciclosporina	14 años/ataxia residual y epilepsia temporal
<b>Controles</b> 15	44/F	-	-	Mielitis recurrente (sin anti-AQP4)	-	Caspr2	Ciclos esteroides / micofenolato	10 años/leve paraparesia atáxica

Pacientes previamente publicados en las referencias [227](\*), [296] (&) y [331] (#). Clasificación histológica de los timomas (Ver Tabla Anexa 4) y del estadio de Masaoka (Ver Tabla Anexa 5). Abreviaturas utilizadas: EL, encefalitis límbica; MG, miastenia gravis; MGFA, Clasificación de miastenia gravis de la fundación americana (Ver Tabla Anexa A6); NMT, neuromiotonía; PLEX (Plasma Exchange), recambio plasmático; IVIg, alta dosis de inmunoglobulinas intravenosas.



nº pacientes (nº pacientes con anticuerpos anti-receptores de Netrina-1)

**Figura R17.- Diagrama de Venn: pacientes con anticuerpos anti-receptores de Netrina-1 positivos en grupos clínicos.** Número de pacientes afectados en cada grupo y número de pacientes con anticuerpos anti-receptores de Netrina-1 entre paréntesis.

Para evaluar la significancia clínica de estos anticuerpos, se realizó un análisis estadístico de su asociación con NMT, MG y timoma. La positividad frente a Caspr2 multiplicó por 18 (OR=17.9) la probabilidad de tener un timoma respecto a los pacientes que no presentaron anticuerpos anti-Caspr2. Si un solo anticuerpo era positivo, la probabilidad de tener timoma se elevó 8.4 veces respecto a los pacientes que no presentaron ningún anticuerpo ( $p = 0.001$ ). Y la positividad de dos anticuerpos (combinación de anticuerpos anti-Caspr2 y anticuerpos anti-DCC o UNC5A), también elevó la probabilidad de presentar un timoma, sin ser posible calcular el OR dado que no hubo ningún paciente sin timoma y positividad para dos anticuerpos. Además, todos los criterios evaluados presentaron una relación significativa con la presencia de NMT. Por ejemplo, la presencia anticuerpos anti-Caspr2 multiplicó por 25 (OR 24.9) la probabilidad de tener NMT, la presencia de anticuerpos anti-DCC lo multiplicó por 8.5 y cuando existieron anticuerpos anti-UNC5A presentes la frecuencia de NMT pasó de

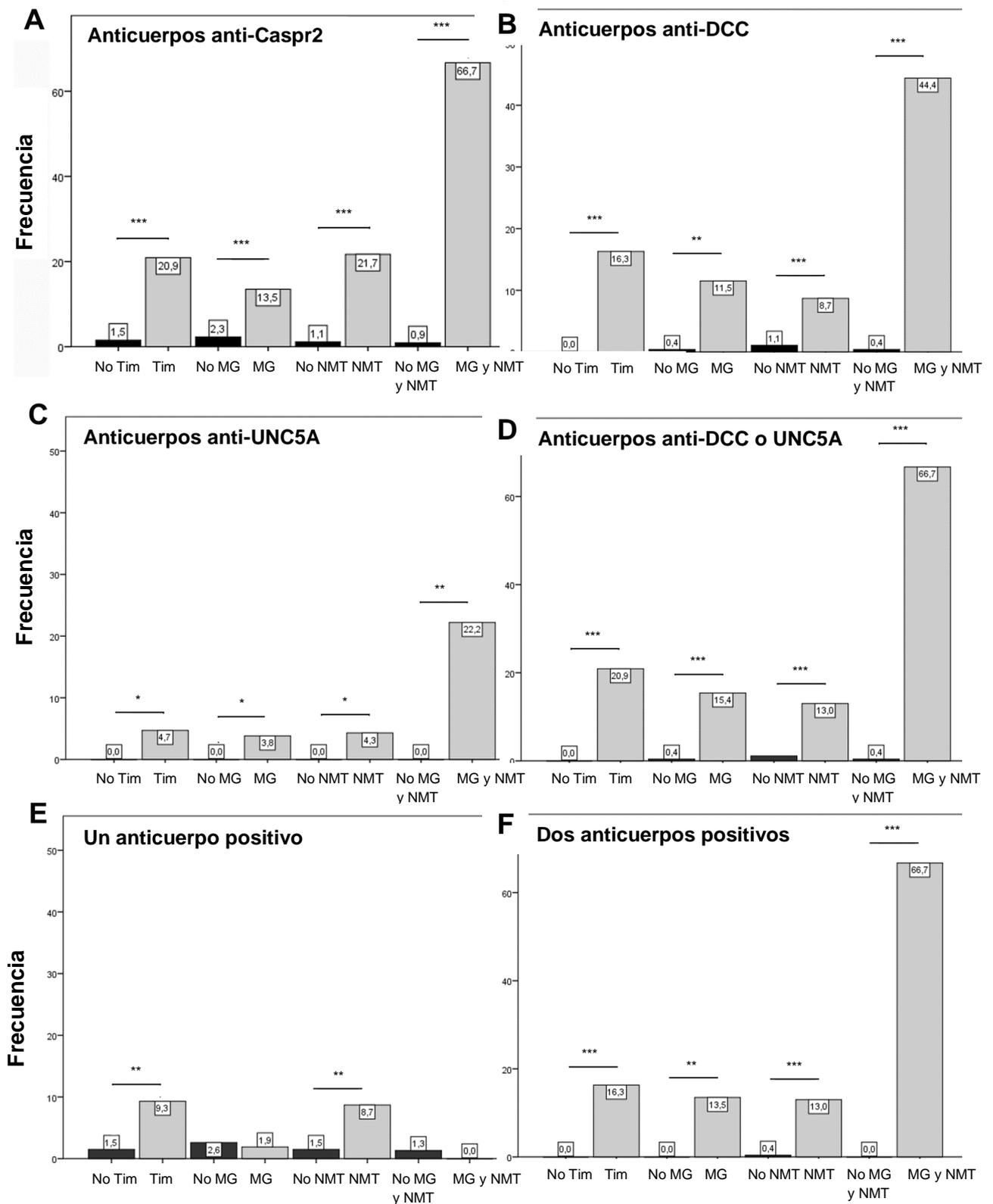
un 12.9% en pacientes seronegativos a un 100% en seropositivos ( $p = 0.021$ ). En cuanto a la MG, todos los criterios excepto la positividad de un solo anticuerpo se asociaron significativamente con la MG ( $p = 0.873$ ), mientras que la positividad frente Caspr2, DCC o UNC5A incrementó el riesgo de MG ( $p < 0.05$ ). Los datos eran aún más llamativos en los pacientes que presentaron una combinación de MG y NMT, donde: la presencia de anticuerpos anti-Caspr2 elevó por 227 el riesgo de presentar este diagnóstico, anti-DCC multiplicó por 182 la probabilidad de tener MG y NMT, y cuando UNC5A era positivo el % de casos con MG y NMT se pasó de un 2.2% a 100% ( $p = 0.001$ ). Por tanto, en nuestro estudio la positividad de los anticuerpos se asoció con una mayor probabilidad de estar afectado por estas enfermedades, véase la **Tabla R10** y la **Figura R18**.

**Tabla R10.** Asociación entre presencia de anticuerpos y diagnóstico clínico.

	Timoma	NMT	MG	NMT y MG
<b>Anticuerpos anti-Caspr2</b>	$p < 0.001^{***}$ OR=17.9 (5.2-61.4)	$p < 0.001^{***}$ OR=24.9 (6.5-94.8)	$p < 0.001^{***}$ OR=6.7 (2.1-20.9)	$p < 0.001^{***}$ OR=227,0 (31.8-1618)
<b>Anticuerpos anti-DCC</b>	$p < 0.001^{***}$ OR ---	$p = 0.001^{**}$ OR=8.5 (1.8-39.5)	$p < 0.001^{***}$ OR=34.5 (4.1-293.7)	$p < 0.001^{***}$ OR=182.4 (17,1-1938)
<b>Anticuerpos anti-UNC5A</b>	$p = 0.018^*$ OR= ---	$p = 0.021^*$ OR= ---	$p = 0.026^*$ OR= ---	$p = 0.001^{**}$ OR= ---
<b>Anticuerpos anti-DCC o UNC5A</b>	$p < 0.001^{***}$ OR ---	$p < 0.001^{***}$ OR=13.4 (3.2-55.9)	$p < 0.001^{***}$ OR=48.1 (5.9-394.7)	$p < 0.001^{***}$ OR=456 (41.2-5046)
<b>Número de positivos (0/1/2)</b>	$p = 0.001^{**}$ OR(0/1)=8.4 (2.0-35.5)	$p = 0.001^{**}$ OR(0/1)=7.4 (1.8-30.9)	$p = 0.873$ OR(0/1)=0.84 (0.10-7.00)	$p = 1.000$ OR(0/1)= ---
	$p < 0.001^{***}$ OR(0/2)= ---	$p = 0.001^{**}$ OR(0/2)=44.5 (5.2-380.2)	$p < 0.001^{***}$ OR ---	$p < 0.001^{***}$ OR ---

Resultados test  $\chi^2$  / Fisher; *odds ratio* (OR) e intervalo de confianza al 95%. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

Nota: Los valores de OR que no se pudieron calcular fueron aquellos que se correspondían con la presencia de anticuerpos anti-Unc5a aislados, dado que siempre existían en combinación con anticuerpos anti-Caspr2, o en los demás casos debido a la ausencia de pacientes seropositivos en los grupos sin timoma, NMT y/o MG. Debido a que no hubo ningún caso con anticuerpos anti-Caspr2 y los dos receptores de Netrina-1 (DCC y UNC5a) se utilizó la variable número de positivos para referirnos a si tenían anticuerpos anti-Caspr2 o la combinación de anticuerpos anti-Caspr2 con anticuerpos anti-DCC o UNC5A.



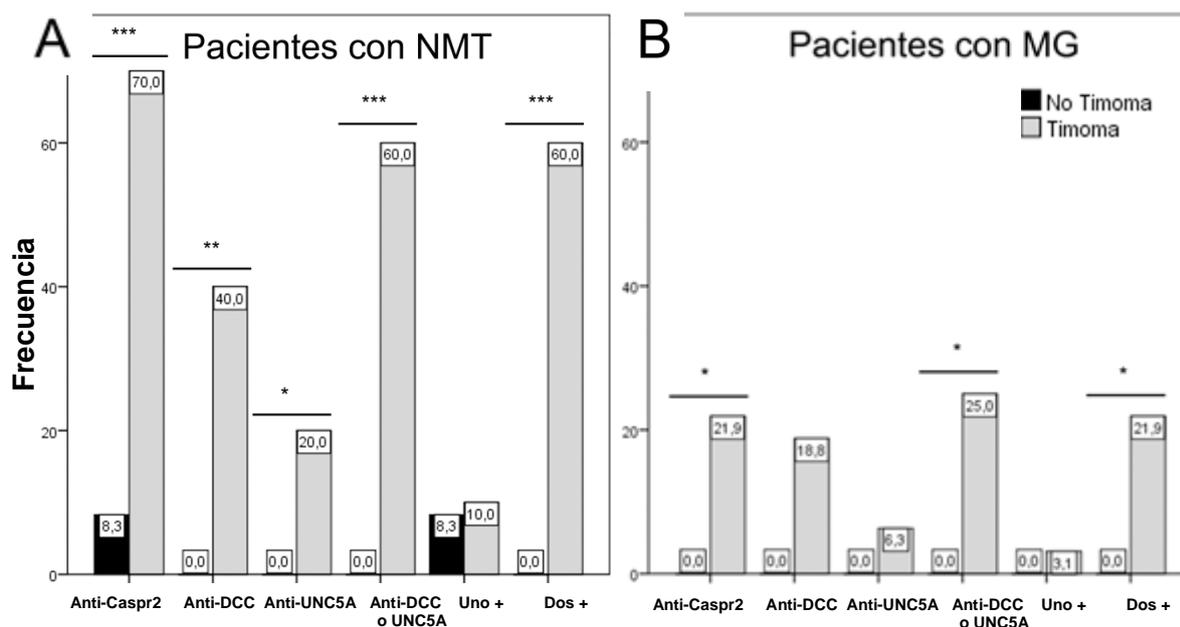
**Figura R18.- Diferencias de anticuerpos positivos según diagnóstico clínico.** Frecuencias de anticuerpos: (A) Anti-Caspr2, (B) Anti-DCC, (C) Anti-UNC5A, (D) Anti-DCC o UNC5A, (E) Un anticuerpo positivo, (F) Dos anticuerpos positivos por grupo clínico (Tim: Timoma, MG: Miastenia gravis, NMT: neuromiotonía). Se representan los resultados del test  $\chi^2$ /Fisher \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  de la Tabla R10.

En pacientes con NMT y/o MG la presencia de anticuerpos anti-Caspr2, DCC o UNC5A se asoció con un timoma ( $p < 0.05$ ), véase la **Tabla R11** y la **Figura R19**.

**Tabla R11.** Asociación entre presencia de anticuerpos y timoma dentro de subgrupos de pacientes con NMT o MG.

	Base: NMT	Base: MG
Anticuerpos anti-Caspr2	$p < 0.001^{***}$ OR=25.7 (4.2-154.6)	$p = 0.035^*$ OR= ---
Anticuerpos anti-DCC	$p = 0.001^{**}$ OR ---	$p = 0.071$ OR= ---
Anticuerpos anti-UNC5A	$p = 0.043^*$ OR= ---	$p = 0.517$ OR= ---
Anticuerpos anti-DCC o UNC5A	$p < 0.001^{***}$ OR ---	$p = 0.017^*$ OR= ---
Número de anticuerpos positivos (0/1/2)	$p = 0.355$ OR(0/1)=3.6 (0.3-47.1)	$p = 1.000$ OR(0/1)= ---
	$p < 0.001^{***}$ OR(0/2)= ---	$p = 0.034^*$ OR(0/2)= ---

Resultados test  $\chi^2$  / Fisher; *odds ratio* (OR) e intervalo de confianza al 95%. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Este análisis no se pudo realizar para el grupo de pacientes con NMT y MG porque todos ellos tenían timoma y no existía un grupo sin timoma con el que comparar el resultado de los anticuerpos.



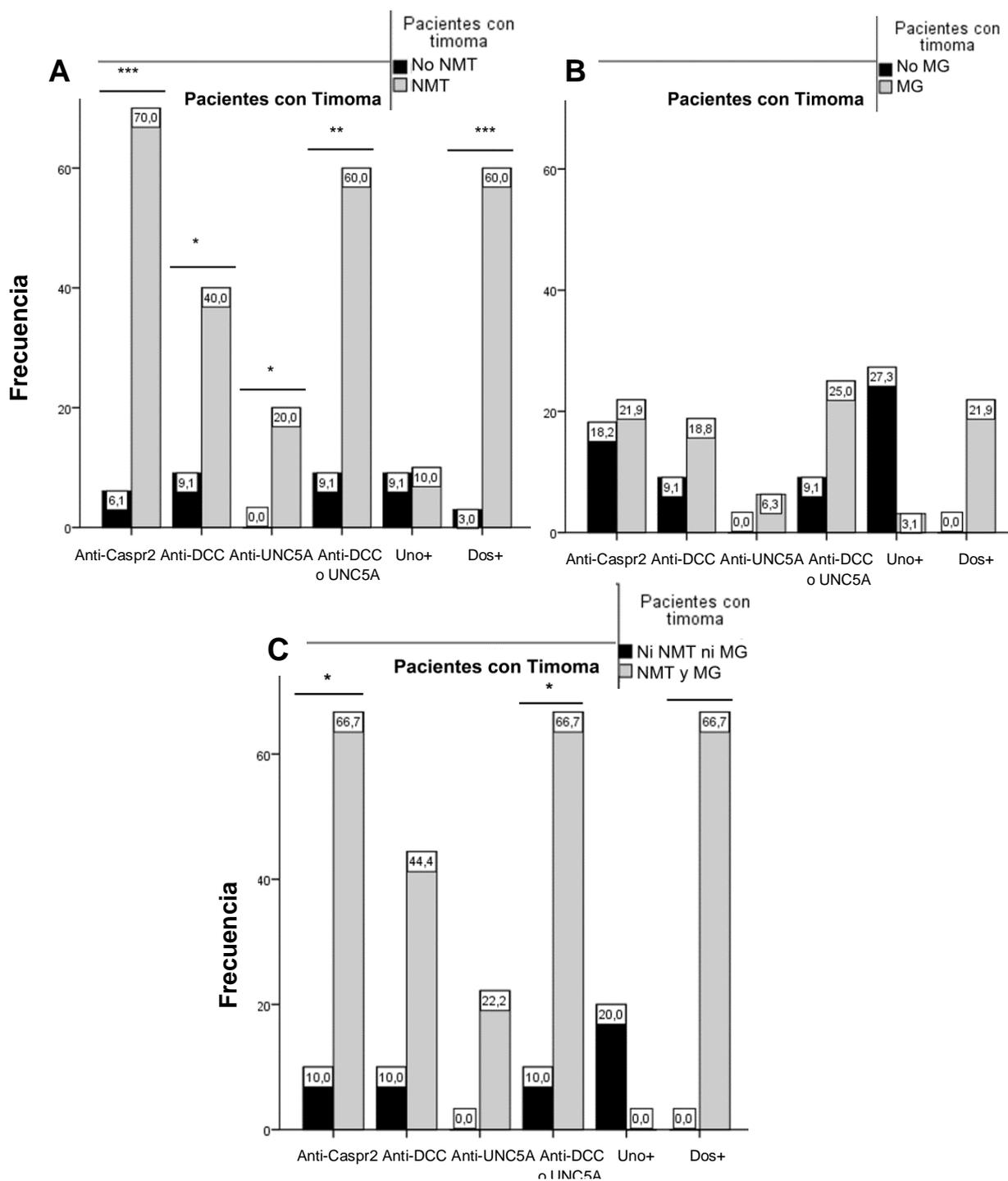
**Figura R19.-** Frecuencia de anticuerpos positivos en los subgrupos de pacientes con NMT o MG. (A) Frecuencia de anticuerpos en el subgrupo de pacientes con NMT según ausencia/presencia de timoma (barras negras y grises respectivamente). (B) Frecuencia de anticuerpos en el subgrupo de pacientes con MG según ausencia/presencia de timoma (barras negras y grises respectivamente). Se representan los resultados del test  $\chi^2$ /Fisher \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  de la Tabla R11.

En pacientes con timoma, la presencia de cualquiera de estos anticuerpos se asoció significativamente con la NMT ( $p < 0.05$ ) pero no con la MG. Esto podría explicarse debido a que en nuestro estudio la presencia de anticuerpos anti-Caspr2/DCC/UNC5A multiplicó por 37 veces el riesgo de timoma en pacientes con MG (OR=37.1;  $p < 0.001$ ), es decir, la presencia de anticuerpos en pacientes con MG se asoció más con el timoma que con los síntomas neurológicos de la MG. Sin embargo, en pacientes con anticuerpos anti-Caspr2, la asociación de un segundo anticuerpo anti-receptor de Netrina-1 se asoció fuertemente con la combinación de NMT, MG y timoma (con insomnio severo característico del Síndrome de Morvan) ( $p = 0.009$ ), véase la **Tabla R12** y la **Figura R20**.

**Tabla R12.** Asociación entre presencia de anticuerpos y enfermedades neuromusculares dentro del subgrupo de pacientes con timoma.

	Base: Pacientes con timoma		
	NMT	MG	NMT y MG
Anticuerpos anti-Caspr2	$p < 0.001^{***}$ OR=36.2 (5.0 -258.9)	$p=0.795$ OR=1.3 (0.2 -7.2)	$p=0.020^*$ OR=18.0 (1.5 -216.6)
Anticuerpos anti-DCC	$p=0.020^*$ OR=6.7 (1.2 -37.8)	$p=0.454$ OR=2.3 (0.2 21.6)	$p=0.141$ OR=7.2 (0.6 -83.3)
Anticuerpos anti-UNC5A	$p=0.049^*$ OR= ---	$p=1.000$ OR= ---	$p=0.211$ OR= ---
Anticuerpos anti-DCC o UNC5A	$p=0.001^{**}$ OR=15.0 (2.6 -85.0)	$p=0.263$ OR=3.3 (0.4 -30.3)	$p=0.020^*$ OR=18.0 (1.5 -216.6)
Número de anticuerpos positivos (0/1/2)	$p=0.390$ OR(0/1)=3.2 (0.3 -41.5)	$p=0.076$ OR(0/1)= 0.1 (0 -1.2)	$p=1.000$ OR(0/1)= ---
	$p < 0.001^{***}$ OR(0/2)=58.0 (5.1 -657)	$p=0.138$ OR(0/2)= ---	$p=0.009^{**}$ OR(0/2)= ---

Resultados test  $\chi^2$  / Fisher; *odds ratio* (OR) e intervalo de confianza al 95%. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura R20.- Frecuencia de anticuerpos positivos en pacientes con timoma según subgrupos de pacientes.** (A) Comparación de la frecuencia de anticuerpos positivos en pacientes con timoma según la ausencia/presencia NMT (barras negras y grises respectivamente). Entre los pacientes con timoma, la positividad de cualquiera de los anticuerpos o dos de ellos positivos se asoció significativamente a la presencia NMT. (B) Comparación de la frecuencia de anticuerpos positivos en pacientes con timoma según la ausencia/presencia de MG (barras negras y grises respectivamente). Entre los pacientes con timoma, la positividad de los anticuerpos no se asoció significativamente con la presencia de MG. (C) Comparación de la frecuencia de anticuerpos positivos en pacientes con timoma según la ausencia/presencia NMT y MG (barras negras y grises respectivamente). Entre los pacientes con timoma, la presencia de anticuerpos anti-UNC5A y anti-DCC positivos tomados individualmente no se manifestó como significativa, pero si Caspr2 y la simultaneidad de dos anticuerpos (Caspr2 más DCC o UNC5A). Se representan los resultados del test Chi<sup>2</sup>/Fisher \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  de la Tabla R12.

Para evaluar el significado clínico de los anticuerpos respecto a su capacidad para predecir el timoma, la MG y la NMT se estudió el valor predictivo positivo (VPP) en nuestra serie. En pacientes con NMT, la presencia de anticuerpos anti-receptores de Netrina-1 (o anticuerpos anti-Caspr2) predijeron el timoma ( $p < 0.05$ ; VPP del 70% para los anticuerpos anti-Caspr2 y un 100% para los anticuerpos anti-receptores de Netrina-1, en nuestra población de estudio). De un modo similar, la presencia de alguno de estos anticuerpos predijeron el timoma en pacientes con MG ( $p < 0.05$ ; VPP del 100% para los anticuerpos anti-Caspr2 y anti-receptores de Netrina-1 en nuestra población de estudio), veáse la **Tabla R13**. Y la presencia de cualquiera de estos anticuerpos predijo la NMT en pacientes con timoma ( $p < 0.05$ , VPP de 78% y 66% para los anticuerpos anti-Caspr2 y anti-receptores de Netrina-1 respectivamente), pero no se asoció con la MG, veáse la **Tabla R14**.

**Tabla R13.** Resultados de anticuerpos según timoma en pacientes con NMT y MG.

			Timoma		
			Total	No	Si
Pacientes con NMT	Anticuerpos anti-Caspr2	Total	46	36	10
		No	36	33	3
		Si	10	3	7
	Anticuerpos anti-DCC/UNC5A	Total	46	36	10
		No	40	36	4
		Si	6	0	6
Pacientes con MG	Anticuerpos anti-Caspr2	Total	52	20	32
		No	45	20	25
		Si	7	0	7
	Anticuerpos anti-DCC/UNC5A	Total	52	20	32
		No	44	20	24
		Si	8	0	8

VPP= (verdaderos positivos/[falsos positivos+verdaderos positivos])\*100. Así, el VPP de timoma para Caspr2 en pacientes con NMT=  $(7/10)*100=70\%$ , el VPP de timoma para receptores de Netrina-1 en pacientes con NMT=  $(6/6)*100=100\%$ , el VPP de timoma para Caspr2 en pacientes con MG=  $(7/7)*100=100\%$  y el VPP de timoma para receptores de Netrina-1 en pacientes con MG=  $(8/8)*100=100\%$ .

**Tabla R14.** Resultados de anticuerpos en pacientes con timoma.

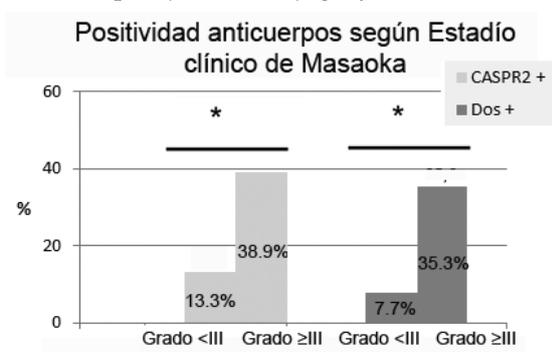
		NMT		
		Total	No	Si
Anticuerpos anti-Caspr2	Total	43	33	10
	No	34	31	3
	Si	9	2	7
Anticuerpos anti-DCC/UNC5A	Total	43	33	10
	No	34	30	4
	Si	9	3	6
		MG		
		Total	No	Si
Anticuerpos anti-Caspr2	Total	43	11	32
	No	34	9	25
	Si	9	2	7
Anticuerpos anti-DCC/UNC5A	Total	43	11	32
	No	34	10	24
	Si	9	1	8

VPP= (verdaderos positivos/[falsos positivos+verdaderos positivos])\*100. Así, el VPP de NMT para Caspr2 en pacientes con timoma= (7/9)\*100=77.8%, el VPP de NMT para receptores de Netrina-1 en pacientes con timoma= (6/9)\*100=66.7%, el VPP de MG para Caspr2 en pacientes con timoma= (7/9)\*100=77.8% y el VPP de MG para receptores de Netrina-1 en pacientes con timoma= (8/9)\*100=88.9%.

Además los anticuerpos anti-Caspr2 solos ( $p = 0.035$ ) o en combinación con anticuerpos anti-DCC/UNC5A, se asociaron con un mayor estadio clínico de Masaoka ( $\geq$ III) de los timomas ( $p = 0.041$ ). Por tanto, la combinación de las características clínicas y la presencia de estos anticuerpos, además de que se asoció con la presencia de un timoma oculto también se asoció con un estadio clínico avanzado, véase la **Tabla R15**.

**Tabla R15.** Dependencia entre presencia de anticuerpos y timoma y gráfico de asociación de estadio clínico de Masaoka.

	Base: Timoma
Anticuerpos anti-Caspr2	$p=0.035^*$
Anticuerpos anti-DCC	$p=0.653$
Anticuerpos anti-UNC5A	$p=0.233$
Anticuerpos anti-DCC o UNC5A	$p=0.232$
Número de anticuerpos positivos (0/1/2)	$p=0.041^*$



Resultados test  $\chi^2$  / Fisher  $^*p<0.05$ ;  $^{**}p<0.01$ ;  $^{***}p<0.001$ . Un 13.3% de los tumores hasta grado II presentaron anticuerpos anti-Caspr2 positivos y un 7.7% tenían dos anticuerpos a la vez. En grados  $\geq$ III la proporción pacientes con anticuerpos positivos superó el 35% ( $p=0.035$  para anticuerpos anti-Caspr2 y  $p=0.041$  para anti-Caspr2 y anti-DCC o UNC5A).

#### **4. Estudio histológico de pacientes con timoma y enfermedades de hiperexcitabilidad periférica.**

En el estudio histológico se utilizaron 25 tejidos tímicos normales de autopsias fetales o perinatales y 20 timomas de pacientes (con MG [n=17] o con MG y NMT [n=3]). No existieron diferencias significativas en la proporción de sexos F: M (9:16 en controles y 7:13 en casos). De los timos sanos seleccionados, siete eran perinatales (media de edad  $16 \pm 20.7$  días) y 18 eran fetales (media de edad  $30 \pm 5.3$  días de gestación). En los casos, la edad de debut de la MG era de  $49 \pm 13$  años y el tiempo medio entre el diagnóstico y la timectomía era de  $5 \pm 4$  meses. Todos los pacientes recibieron tratamiento con esteroides antes de la realización de la timectomía. En el debut de la MG un 45% de los casos presentaron una MG moderada con debilidad de predominio bulbar (tipo IIB), seguidos de un 20% con una MG generalizada (tipo I), un 15% MG leve con predominio axial (tipo IIa) y un 10% MG moderada con predominio bulbar (tipo IIIB) y limitada a la región ocular (tipo I ocular). Ver la clasificación de MG en la **Tabla anexa A6**.

El tipo histológico más frecuente en nuestra serie era el B2 o cortical (45%), seguido del B1 o rico en linfocitos (30%), B3 o epitelial (15%) y en igual frecuencia el A o medular y C o carcinoma tímico escamoso (5%). La clasificación histológica de los timomas utilizada puede verse en la **Tabla anexa A4**. Al diagnóstico histológico, gran parte de los tumores presentaron un estadio avanzado: aproximadamente la mitad de los casos presentaron un timoma con invasión microscópica de la cápsula (Estadio IIA de Masaoka), en un 40% de los casos se produjo invasión macroscópica del tejido adiposo (Estadio IIB de Masaoka), en un 10% de los casos se invadieron vasos sanguíneos o pulmón (Estadio III de Masaoka) y solo un 5% de los casos tuvieron un tumor encapsulado (Estadio I de Masaoka). El sistema de estadificación de Masaoka puede

verse en la **Tabla anexa A5**. Los tres pacientes con NMT presentaron tumores invasivos (Estadío IIA, IIB y III de Masaoka de tipo histológico B1, C o B2 respectivamente). La relación entre el subtipo de MG, subtipo histológico y estadificación de Masaoka del tumor puede verse en la **Tabla R16**.

**Tabla R16.** Dependencia entre el tipo de MG al debut respecto al tipo histológico y estadio del timoma.

Tipo de MG al debut	Tipo Histológico	Estadío de Masaoka
I general, n (%) (n=4)	2 (66.7%) B2; 1 (16.7%) B1, C	2 (50%) Ila; 2 (50%) Iib
I ocular, n (%) (n=2)	2 (100%) B2	1 (50%) Ila, 1 (50%) III
Ila, n (%) (n=3)	2 (66.7%) B1, 1 (33.3%) B2	2 (66.7%) Ila, 1 (33.3%) Iib
Iib, n (%) (n=9)	3 (33.3%) B2, B1, B3	5 (55.6%) Iib, 2 (22.3%) Ila, 1 (11.1%) III, I
IIIb, n (%) (n=2)	1(50%) B2; 1 (50%) A	2 (100%) Ila

Los criterios subtipo de MG al debut respecto al subtipo histológico del timoma o el estadio de Masaoka en nuestra muestra eran independientes, los resultados del test  $\chi^2$  son  $p > 0.05$   $p = 0.178$  y  $0.586$  respectivamente. No se observó una asociación entre el tipo histológico y el estadio de Masaoka  $p = 0.566$ . La clasificación de MG según la MGFA, el subtipo histológico según la clasificación de la OMS 2014 y el estadio según la clasificación de Masaoka puede verse en las tablas anexas A6, A4, A5 respectivamente. Los pacientes con NMT presentaron MG al debut de tipo I general (tipo histológico B2 y C y estadio de Masaoka III y Iib respectivamente) o tipo Ila (tipo histológico B1 y estadio de Masaoka Iib).

Todos los pacientes con MG tenían anticuerpos de tipo IgG frente al AChR del músculo (media  $7.3 \pm 6.7$  nmol/L). Además se estudió la presencia de otros anticuerpos dirigidos frente a proteínas: nucleares en el 20% de los casos (20% anticuerpos anti-nucleares ANA o anti-DNA de doble cadena, 5% anti-histonas, 5% anti-nucleosomas, 5% anti-proteína P ribosomal y 5% anti-núcleo de células en proliferación), musculares en el 75% de los casos (40% anticuerpos anti-titina, 20% anti-PL-12, 15% anti-Ku, 10% anti-PM-Scl y 5% anti-Ro-52) y relacionadas con la función tiroidea en un 20 % de los casos (15% anticuerpos anti-tiroglobulina y anti-peroxidasa microsomal). Además, un 68% de los pacientes presentaron un aumento de la creatina quinasa en suero. Las características clínicas de los pacientes se detallan en la **Tabla R17**.

**Tabla R17.** *Características clínicas de los pacientes.*

Variables	Número de pacientes (n=20)	%
<b>Sexo</b>		
Masculino	16	80.0%
Femenino	9	20.0%
<b>Edad al debut de la MG</b>		
Mediana [Rango]	46 [33-72]	
< 46	10	50.0%
≥ 46	10	50.0%
<b>Clasificación OMS 2014</b>		
Tipo A	1	5.0%
Tipo B1	6	30.0%
Tipo B2	8	45.0%
Tipo B3	3	15.0%
Tipo C	1	5.0%
<b>Estadio de Masaoka</b>		
I	1	5.0%
IIa	9	45.0%
IIb	8	40.0%
III	2	10.0%
<b>Clasificación MG al debut</b>		
I generalizada	4	20.0%
I ocular	2	10.0%
IIa	3	15.0%
IIb	9	45.0%
IIIb	2	10.0%
<b>Otras alteraciones</b>		
Ausentes	16	80.0%
NMT	3	15.0%
LEMS	1	5.0%
<b>Titulos de anticuerpos anti-AChR (nmol/L) (n(nmol/L)</b>		
< 0.5	0	0.0%
≥ 0.5	18	90.0%
Desconocidos	2	10.0%
<b>Otros anticuerpos</b>		
Musculares	15	75.0%
Nucleares	11	55.0%
Función tiroidea	4	20.0%
<b>CKs máximas (UI/L)</b>		
Mediana [Rango]	261 [70-723]	
<145	6	31.6%
≥145	13	68.4%

Abreviaturas utilizadas: AChR, *acetylcholine receptor*; CKs, creatina-quinasa en suero; LEMS, síndrome miasténico de Lambert-Eaton; MG, miastenia gravis; NMT, neuromiotonía; OMS, Organización mundial de la salud.

Para el estudio histológico se utilizaron marcadores de la estructura tímica: el receptor de células T (CD3) para marcar células T, el receptor de células B (CD20) para marcar células B, la glicoproteína de superficie de células T corticales (CD1a) para las células T corticales y queratinas de amplio espectro (citoqueratina, CK AE1/AE3) que marcan diferentes tipos de células epiteliales. Además, se estudiaron marcadores de la función inmunitaria: las MHC de clase II (HLA-DP, DQ y DR) que participan en la presentación de antígenos a células T, el regulador de la transcripción AIRE que promueve la expresión ectópica de autoantígenos en las células medulares epiteliales tímicas y FOXP3, una proteína expresada en células T reguladoras que participa en la regulación de la autoinmunidad en la periferia. También, se evaluaron la presencia de células neuroendocrinas (cromogranina) y células mioideas (desmina) que pudiesen participar en la presentación de antígenos.

Para analizar las diferencias entre tejido sano y timomas de pacientes con MG se asignó al tejido un porcentaje de área ocupada por cada marcador respecto al tejido total estudiado. En los controles, el tejido tímico (% CD3<sup>+</sup>) constituyó un promedio de un 36.09% del tejido total analizado ( $\bar{\delta}$ :  $\pm 17.50\%$ , rango: 19-53%), mientras que en los casos ocupó un promedio del 27.02% del tejido ( $\bar{\delta}$ : 21,50%, rango: 6-48%). Respecto al área ocupada por la corteza (%CD1a<sup>+</sup>), en los sanos ocupó un promedio de un 32.78% del tejido total analizado ( $\bar{\delta}$ : 19.94%, rango: 13-51%) y en los casos un promedio del 28.58% ( $\bar{\delta}$ : 21.55%, rango: 7-49%). Pese a existir un menor promedio de tejido tímico y células T corticales en las muestras de los pacientes estudiados respecto a los timos de individuos sanos, no existían diferencias significativas entre las medias ( $p = 0.063$  y  $0.254$  respectivamente). Los estadísticos descriptivos y el análisis estadístico de las medias de %CD1a<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> por grupos pueden verse en la **Tabla R18**.

**Tabla R18.** Estadísticas de grupo y prueba de medias de las variables %CD1a<sup>+</sup> y %CD3<sup>+</sup>.

Marcador	Grupo	N	Media	Desviación estándar (δ)		
% CD3 <sup>+</sup>	Individuos sanos	25	36.088	17.497		
	Timoma	20	27.022	21.497		
%CD1a <sup>+</sup>	Individuos sanos	25	32.718	19.941		
	Timoma	20	28.575	21.551		
		F	Sig	t	GI	Sig (unilateral)
%CD3 <sup>+</sup>	Asumiendo varianzas iguales	2.809	0.101	-1.560	43	<b>0.063</b>
	No asumiendo varianzas iguales			-1.525	36.385	0.068
%CD1a <sup>+</sup>	Asumiendo varianzas iguales	0.366	0.549	-0.668	43	<b>0.254</b>
	No asumiendo varianzas iguales			-0.662	39.333	0.256

Para contrastar la hipótesis de igualdad de medias se utilizaron los resultados de la fila denominada “asumiendo varianzas iguales”: el estadístico t de la prueba t-student para igualdad de medias de la variable %CD3<sup>+</sup> tuvo un valor de -1.560 con un nivel crítico unilateral de 0.063 y el estadístico t de la prueba t-student para igualdad de medias de la variable %CD1a<sup>+</sup> con un valor -0.668 y un nivel crítico unilateral asociado de 0.254. Como en ambos casos era  $p > 0.05$ , se aceptó la hipótesis nula de igualdad de medias entre los grupos para %CD3<sup>+</sup> y CD1a<sup>+</sup> (tejido tímico y cortical respectivamente). Es decir, ambas poblaciones presentaron las mismas propiedades estadísticas en lo que a media y varianza se refería. Hay que tener en cuenta que no existió una evidencia estadística clara del marcador CD3, al estar tan próximo a la zona crítica sería recomendable ampliar el número de elementos muestrales para corroborar esta evidencia en uno u otro sentido.

Sin embargo, existió una proporción significativamente diferente de células epiteliales y células B en los casos respecto a los controles ( $p < 0.05$ ,  $p = 0.004$  y  $0.023$  respectivamente). Los descriptivos y los resultados del análisis estadístico pueden verse en la **Tabla R19**. En los controles el tejido epitelial (%CK AE1/AE<sup>+</sup>) ocupó un promedio de un 15.13% del tejido total (δ: 10.48%, rango: 5-25%) y los infiltrados de células B (%CD20<sup>+</sup>) constituyeron un promedio de un 0.58% (δ: 0.67%, rango: 0.5-1.15) del tejido total analizado, mientras que en los casos el tejido epitelial formó parte de un promedio del 29.20% (δ: 22.27%, rango: 7-51%) y los infiltrados de células B constituyeron un promedio de un 1.8% del tejido total analizado (δ: 2.78%, rango: 0.5-4.3%).

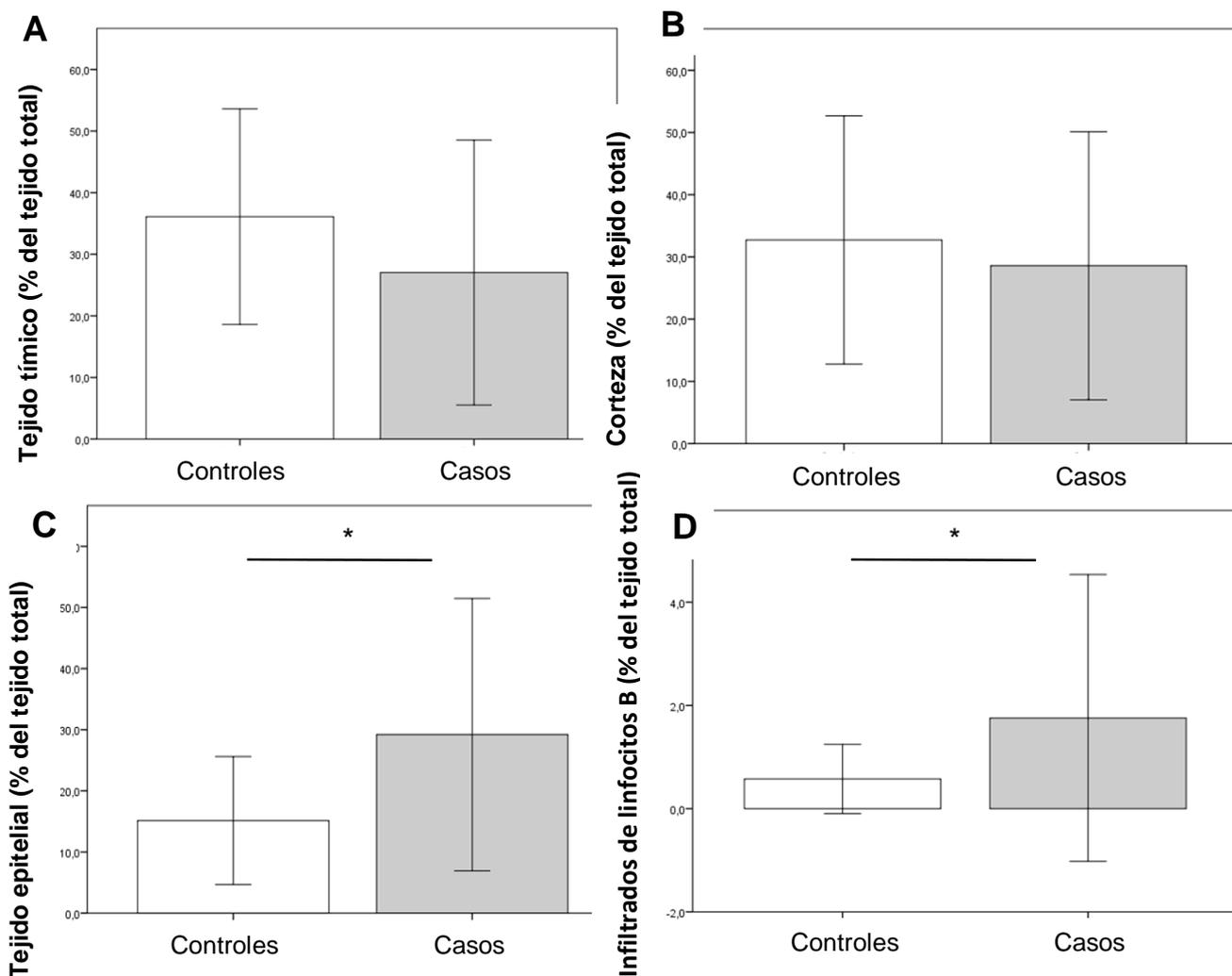
**Tabla R19.** Estadísticas de grupo y prueba de medias de las variables %CK AE1/AE3<sup>+</sup> y %CD20<sup>+</sup>.

Marcador	Grupo	N	Media	Desviación estándar (δ)		
% CK AE1/AE3 <sup>+</sup>	Individuos sanos	25	15.131	10.482		
	Timoma	20	29.200	22.272		
%CD20 <sup>+</sup>	Individuos sanos	25	0.575	0.134		
	Timoma	20	1.757	2.780		
		F	Sig	t	gl	Sig (unilateral)
%CK AE1/AE3 <sup>+</sup>	Asumiendo varianzas iguales	10.070	0.003	2.800	43	<b>0.004*</b>
	No asumiendo varianzas iguales			2.604	25.691	0.008
%CD20 <sup>+</sup>	Asumiendo varianzas iguales	4.516	0.039	2.057	43	<b>0.023*</b>
	No asumiendo varianzas iguales			1.858	20.776	0.028

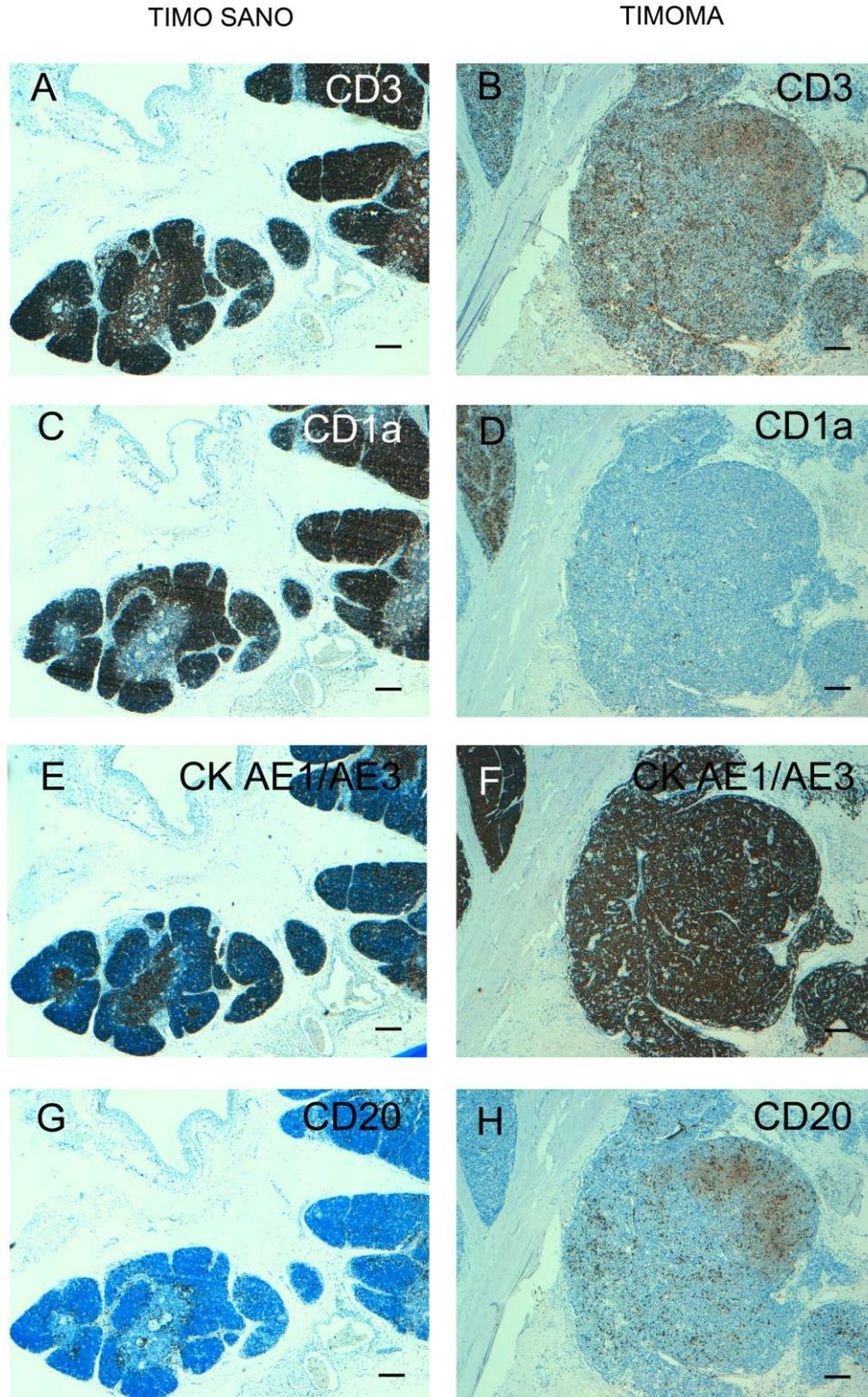
Para contrastar la hipótesis de igualdad de medias se utilizaron los resultados de la fila denominada “asumiendo varianzas iguales”: el valor estadístico t de la prueba t-student para igualdad de medias de la variable %CK AE1/AE3<sup>+</sup> era 2.800 con un nivel crítico unilateral de 0.004 y en la variable %CD20<sup>+</sup> el valor del estadístico t era 2.057 con un nivel crítico unilateral de 0.023. Como en ambos casos era  $p < 0.05$ , se rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias entre los grupos para %CK AE1/AE3<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> (tejido epitelial e infiltrados de células B respectivamente). \* $p < 0.05$

Además, las células B, en lugar de ocupar la región cortico-medular, presentaron una distribución desorganizada por todo el tumor, aunque preferentemente se encontraron en el área de diferenciación medular.

Las características morfométricas de los marcadores de estructura tímica de casos y controles están resumidas gráficamente en la **Figura R21**, también pueden verse ejemplos de la histología observada en el timo sano y timomas de los pacientes en la **Figura R22**.



**Figura R21.- Cuantificación de los compartimentos tímicos en casos y controles.** El **panel A** muestra el porcentaje de área de tímica respecto al área total estudiada (incluyendo tejido conectivo). El porcentaje de área ocupada por timocitos corticales, por el tejido epitelial o por infiltrados de células B respecto al área total estudiada se muestra en el **panel B, C y D** respectivamente. Las barras indican la media y desviación estándar ( $\delta$ ) de cada porcentaje en cada grupo. Las diferencias entre medias significativas se muestran en la figura. \*  $p < 0.05$ .



**Figura R22.-** Diferentes compartimentos tímicos en muestras de timo sano (panel de la izquierda) y timoma (panel de la derecha) con MG. Las técnicas de inmunohistoquímica señalaron: (A, B) el componente de células T (área CD3<sup>+</sup>); (C, D) las células T corticales (área CD1a<sup>+</sup>); (E, F) las células epiteliales (área citoqueratina AE1/AE3<sup>+</sup>) y (G, H) los infiltrados de células B (área CD20<sup>+</sup>). El componente epitelial y de células B estaba aumentado en los casos respecto a los controles (las células B además no se localizaron exclusivamente en la región cortico-medular). Barra de escala: 200µm.

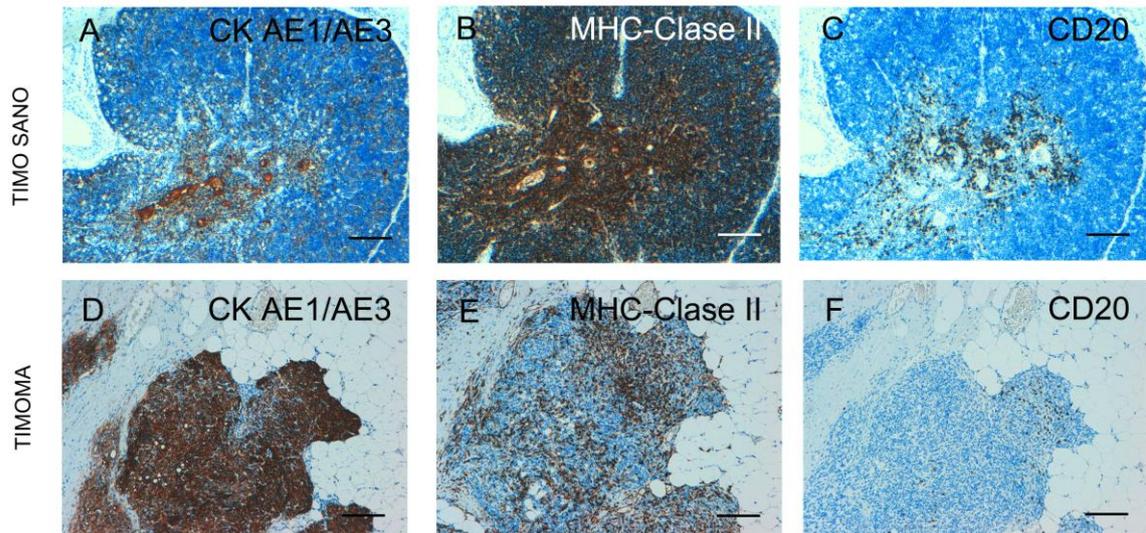
Los resultados del análisis estadístico de los marcadores seleccionados de la función inmunitaria (MHC de clase II [HLA-DP, DQ, DR], AIRE y FOXP3) en casos y controles están resumidos en la **Tabla R20**.

**Tabla R20.** *Marcadores de función inmunitaria en casos y controles.*

Marcadores inmunitarios	Casos	Controles	Valor Chi <sup>2</sup>	gl	Sig asintótica
<b>AIRE, número positivos/total</b>	18/24	12/20	1.131	1	<b>0.287</b>
<b>FOXP3, número positivos/total</b>	5/25	8/19	2.534	1	<b>0.111</b>
%MHC de clase II	F	Sig	t	gl	Sig (unilateral)
Asumiendo varianzas iguales	0.105	0.748	-1.694	42	<b>0.049*</b>
No asumiendo varianzas iguales			-1.694	40.524	0.049

Abreviaturas utilizadas: MHC, moléculas de histocompatibilidad; FOXP3, *forkhead box P3*; AIRE, *autoimmune regulator*,  $\delta$ , desviación estándar. En la distribución Chi<sup>2</sup> con un grado de libertad, el valor 1.131 tuvo asociada una probabilidad de 0.287 para AIRE y un valor de 2.534 con una probabilidad de 0.111 para FOXP3. Dado que  $p > 0.05$ , por tanto, tuvimos evidencia estadística para aceptar la hipótesis de independencia y concluir que las variables AIRE o FOXP3 y el grupo no estaban relacionadas. Para contrastar la hipótesis de igualdad de medias se utilizaron los resultados de la fila encabezada por "asumiendo varianzas iguales", el valor estadístico t -1.694 tuvo asociado un nivel crítico unilateral de 0.049, al ser  $p < 0.05$  pudimos concluir que existieron evidencias estadísticas de diferencias entre medias de los grupos. No obstante, en este caso al estar tan próximo a la zona crítica convendría analizar un mayor número de elementos muestrales para corroborar esta evidencia en uno u otro sentido. \* $p < 0.05$ .

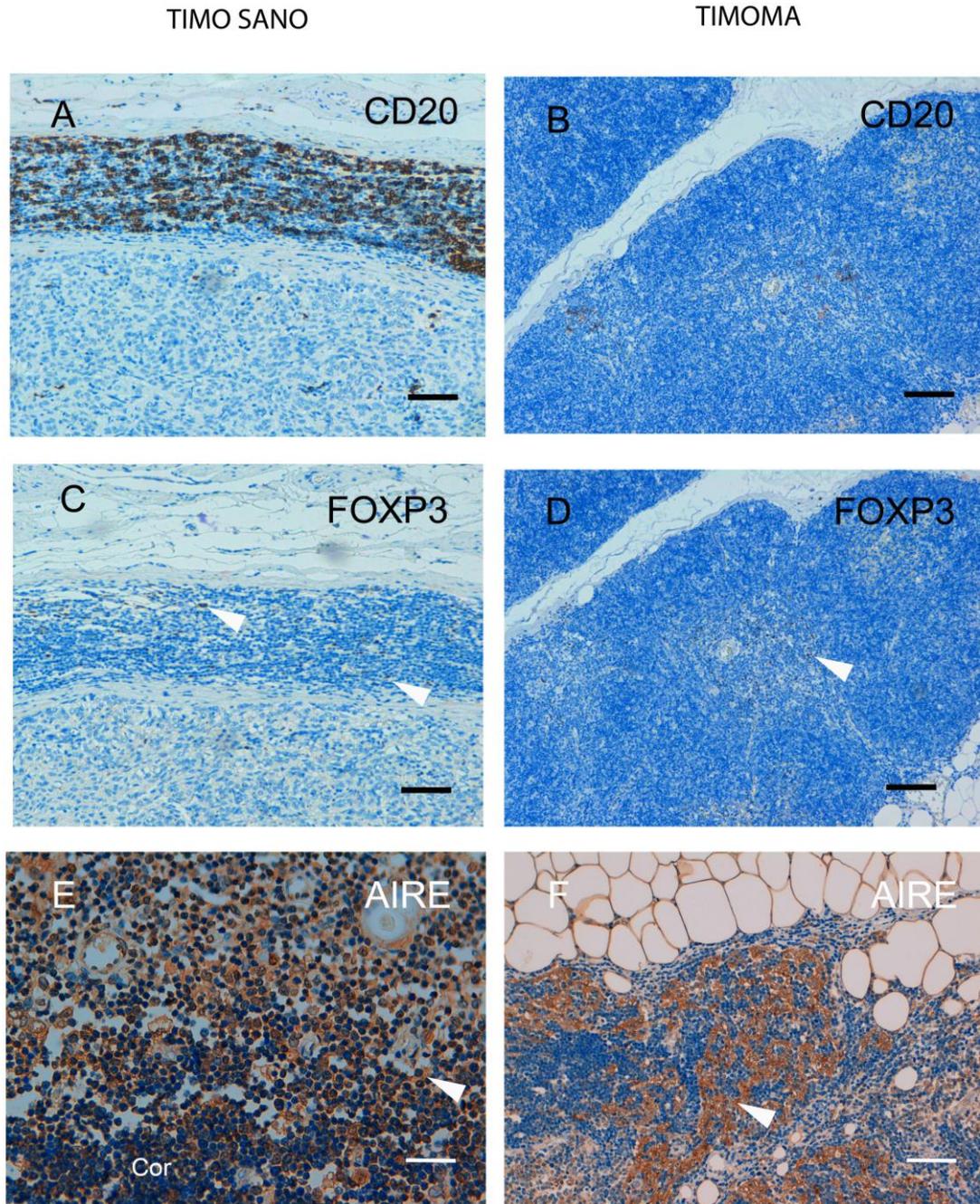
Además de existir diferencias significativas entre medias respecto al área relativa del componente epitelial en los timomas estudiados, también existieron diferencias significativas en cuanto al % relativo de MHC de clase II ( $p = 0.049$ ). Las MHC de clase II ocuparon una media de un 20.01% del tejido total en los timomas y un 29.19% del tejido total en los individuos sanos ( $\delta$ : 17.938 y 17.869 respectivamente). Las MHC de clase II se expresaron fuertemente en células epiteliales medulares tímicas y en los corpúsculos de Hassall en los timos sanos, mientras que en los timomas se expresaron en zonas medulares tímicas **Figura R23**. Además, en el 80% de los timomas estudiados los corpúsculos de Hassall estaban ausentes ( $p < 0.001$ ,  $p = 2.5 \cdot 10^{-8}$ ) y en un caso su localización estaba alterada, ya que los corpúsculos ocupaban la periferia del tejido.



**Figura R23.-** Expresión de MHC de clase II en timo sano (panel superior) y pacientes con tímoma y MG (panel inferior). Las tinciones inmunohistoquímicas señalaron que las áreas de células epiteliales tímicas que expresaron MHC de clase II (**B, E**) estaban próximas a áreas que contenían células epiteliales tímicas citoqueratina AE1/AE3<sup>+</sup> (**A, D**) y células B CD20<sup>+</sup> (**C, F**). Barras de escala: 200  $\mu$ m.

No existieron diferencias significativas entre casos y controles en el número de casos con células FOXP3 ( $p = 0.111$ ). La tinción de células FOXP3 se detectó en el núcleo de algunas células T que se encontraron principalmente en áreas medulares próximas a áreas que contenían células B (CD20<sup>+</sup>).

No existieron diferencias significativas entre casos y controles respecto a la expresión de AIRE, el 40% de los timomas y el 25% de los controles no expresaron AIRE ( $p = 0.287$ ). En el timo normal, la tinción de AIRE se detectó en el citoplasma de las células epiteliales localizadas en la médula y alrededor de los corpúsculos de Hassall; en los timomas, en los casos en los que existían células epiteliales AIRE<sup>+</sup> tenían una localización difusa **Figura R24**.



**Figura R24.-** Expresión de FOXP3 y AIRE (puntas de flecha) en timo sano (panel de la izquierda) y en el timoma de pacientes con MG (panel de la derecha). Inmunotinción de células B (CD20<sup>+</sup>) en timo y timoma (A, B respectivamente) cerca de áreas con expresión de FOXP3 en timo y timoma (C, D respectivamente); AIRE se expresaba en el citoplasma de células epiteliales tímicas en la zona medular y con menor expresión en el área cortical (Cor) en timo sano (E); en los timomas AIRE se expresaba difusamente en el citoplasma del componente epitelial (F). Barra de escala: 200  $\mu$ m.

#### 4.1 Expresión de los antígenos en el timo sano y en el timoma de los pacientes.

Se estudió la presencia de células mioides (desmina<sup>+</sup>) y zonas de diferenciación neuroendocrina (cromogranina A<sup>+</sup>), que podrían expresar antígenos de células musculares o neuroendocrinas. En general no existían células mioides (excepto en un caso) ni células neuroendocrinas en los timomas estudiados ( $p = 0.029$  y  $0.002$ , respectivamente). Los resultados estadísticos de los marcadores pueden verse en la **Tabla R21**.

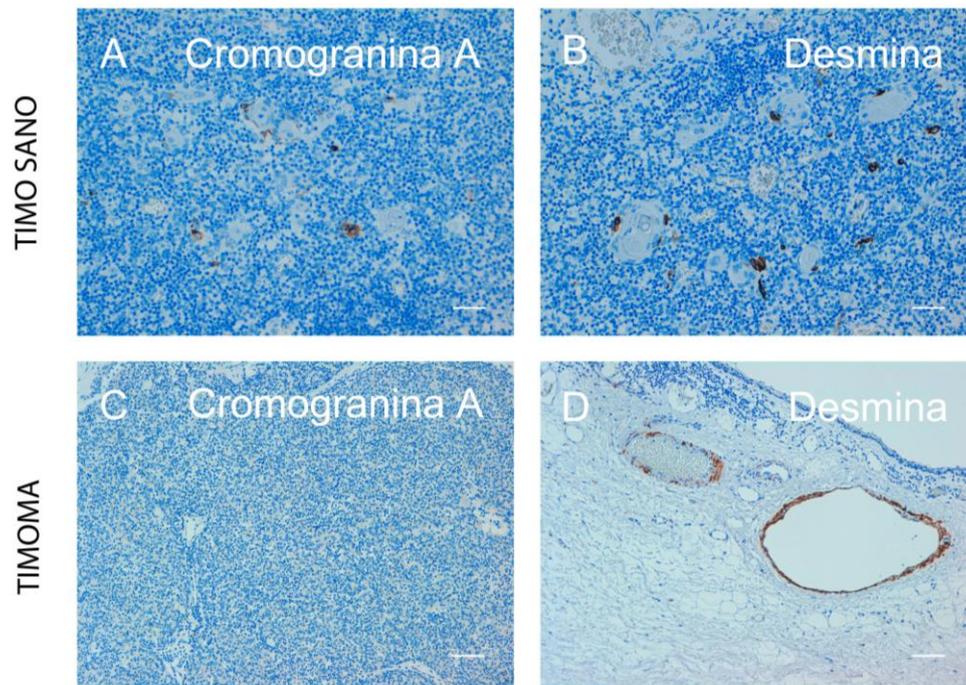
**Tabla R21.** *Marcadores de células mioides y neuroendocrinas.*

Marcadores	Controles	Casos	Valor Chi <sup>2</sup>	gl	Sig asintótica
Cromogranina A, número positivos/total	10/25	0/19	9.835	1	<b>0.002*</b>
Desmina, número positivos/total	8/25	1/19	4.743	1	<b>0.029*</b>

La distribución Chi<sup>2</sup> con un grado de libertad, el valor de 9.835 tuvo asociada una probabilidad de 0.02 en la variable cromogranina A, mientras que la distribución Chi<sup>2</sup> con un grado de libertad, el valor 4.743 tuvo asociada una probabilidad de 0.029 en la variable desmina, respectivamente. En ambos casos  $p < 0.05$  tuvimos una evidencia estadística para poder rechazar la hipótesis de independencia entre las variables grupo y cromogranina A o desmina. \* $p < 0.05$

En los timos sanos, tanto las células mioides como las células neuroendocrinas se encontraban en áreas medulares muy próximas a los corpúsculos de Hassall. En el único caso con células desmina<sup>+</sup>, éstas también ocuparon áreas de diferenciación medular.

Pueden verse ejemplos de la distribución de estas células en la **Figura R25**.



**Figura R25.- Expresión de marcadores de células mioides y neuroendocrinas en timo sano y timoma de pacientes con MG.** Las técnicas de inmunoperoxidasa mostraron la presencia de células neuroendocrinas (cromogranina A<sup>+</sup>) (A) y células mioides (desmina<sup>+</sup>) (B) próximas a los corpúsculos de Hassall en la médula de timos sanos; en pacientes con timoma no se detectaron células neuroendocrinas (C), ni mioides (salvo en un caso) (D) puede verse el marcaje con desmina de los vasos sanguíneos del tumor. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

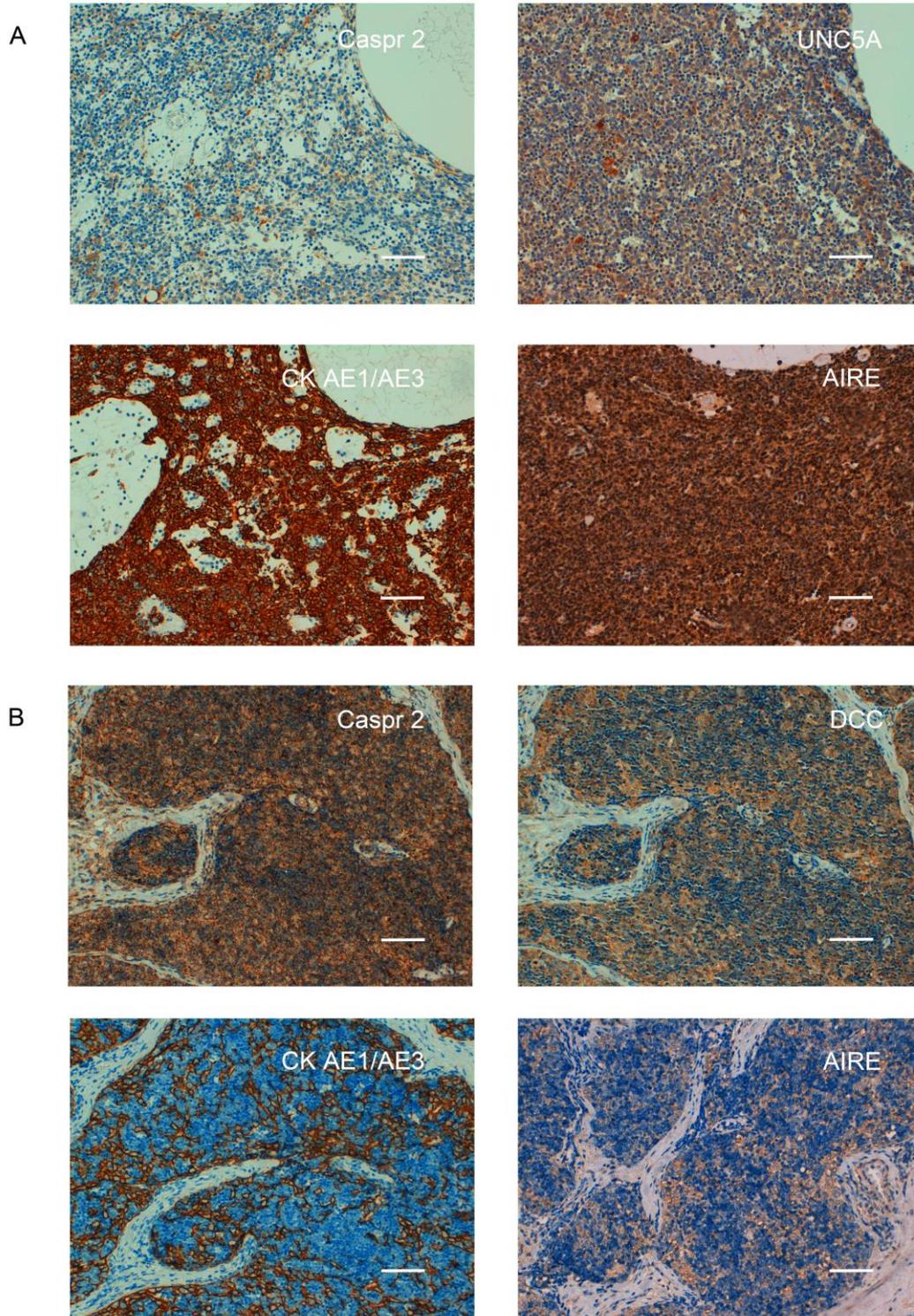
La expresión de marcadores específicos de células epiteliales (citoqueratina AE1/AE3), linfocitos T (CD3), linfocitos B (CD20), células presentadoras de antígenos (MHC de clase II), el promotor de la transcripción AIRE, así como la expresión de las proteínas: Caspr2, DCC y UNC5A, se evaluó mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos sobre secciones de timos de individuos sanos y timomas (pacientes 1, 2 y 8 de la **Tabla R9**, todos con anticuerpos anti-Caspr2 y receptores de Netrina-1 positivos). Los resultados de todos los marcadores analizados pueden verse en la **Tabla R22**.

**Tabla R22.** Resultados expresión de Caspr2, DCC y UNC5A.

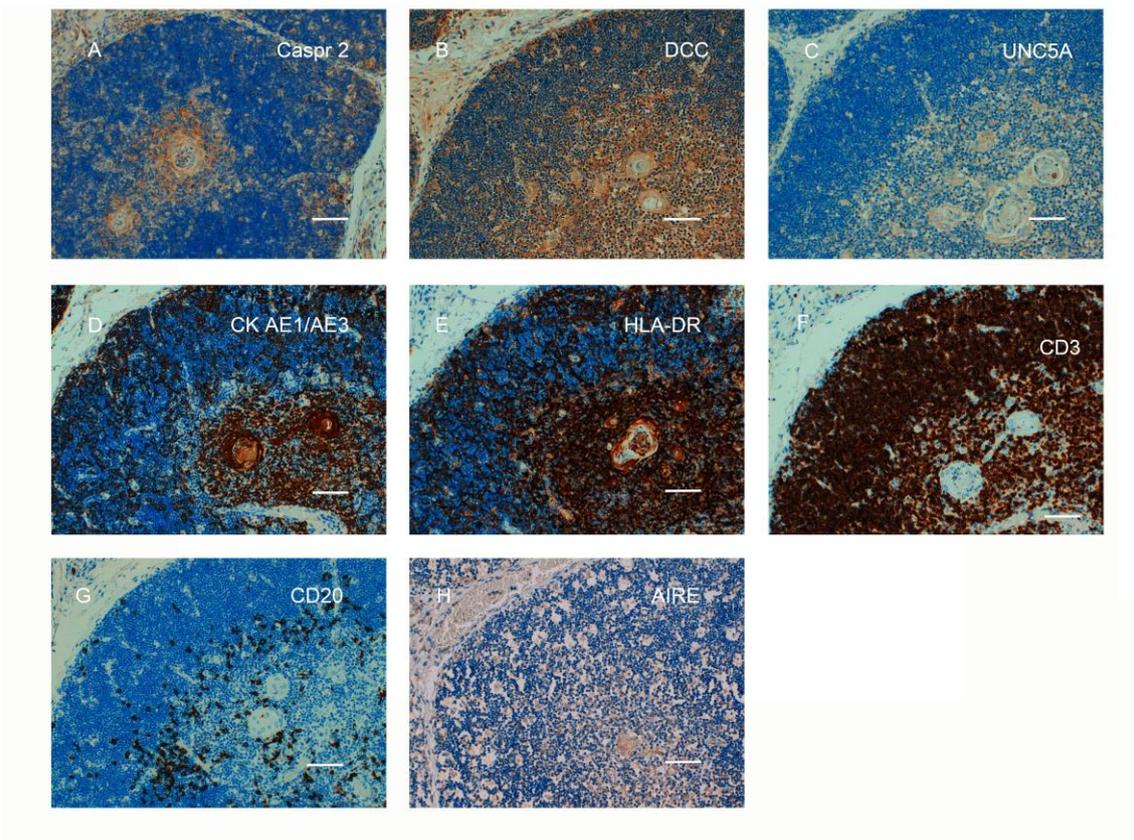
	Timoma			Timo sano						
	Caso 1	Caso 2	Caso 8	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
Caspr2	+	+++	++	++	++	+	+	+++	+	+++
DCC	+	+++	+	+	+++	0	0	+	0	+
UNC5A	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+
CD3	+	++	++	++	++	++	++	++	++	+++
Citoqueratina CK AE1/AE3	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
CD20	0	++	+	+	+	+	+	0	0	0
MHC de Clase II	0	+	+	++	+	+	++	++	++	+
AIRE	+	+++	+	+	0	++	++	++	++	+

Puntuación: 0, negativo; 1+, inmunoreactividad débil; 2+, inmunoreactividad moderada; y 3+, inmunoreactividad fuerte.

Los anticuerpos anti-Caspr2, DCC y UNC5A tiñeron la membrana y el citoplasma de las células epiteliales neoplásicas de los timomas analizados, véase la **Figura R26**. Además, estos antígenos también se expresaron en el estroma de las células epiteliales del cortex y la médula de la mayoría de los timos normales analizados. En todos los casos de individuos sanos la tinción era especialmente intensa alrededor de los corpúsculos de Hassall. En estas zonas también expresaron el promotor de la transcripción de antígenos AIRE y las MHC de clase II, características de las células presentadoras, véase la **Figura R27**.



**Figura R26.- Inmunohistoquímica de los timomas de pacientes seropositivos.** Las células epiteliales neoplásicas del timoma de los pacientes seropositivos presentaron una tinción de Caspr2, DCC o UNC5A en la membrana, el citoplasma o ambos de las células epiteliales neoplásicas. La citoqueratina (CK AE1/AE3) marcó células epiteliales neoplásicas en áreas con expresión de AIRE. (A) Timoma del paciente 2 de la **Tabla R9**; (B) Timoma del paciente 8 de la **Tabla R9**. Barras de escala: 50  $\mu$ m.



**Figura R27.- Inmunohistoquímica de Caspr2, DCC, UNC5A en timo sano.** Secciones de timo del control C2 de la Tabla R15 se tiñeron con anticuerpos específicos frente a Caspr2, DCC, UNC5A, citoqueratina (CK AE1/AE3), HLA-DR, CD3 y CD20. (A-C) Caspr2, DCC y UNC5A tiñeron la membrana y el citoplasma de las células epiteliales del timo sano. La tinción era especialmente intensa en la región medular cerca de los corpúsculos de Hassall; (D) Células epiteliales y corpúsculos de Hassall CK AE1/AE3<sup>+</sup> en la región medular; (E) Células presentadoras de antígenos próximas a la región de expresión de los antígenos expresaban la molécula de clase II HLA-DR en la superficie; (F) Células T CD3<sup>+</sup> más abundantes en la corteza; (G) Infiltrados de células B CD20<sup>+</sup> en la región cortico-medular. Barras de escala: 100 μm.

La expresión de AIRE en los tumores de los pacientes analizados, podría indicar que la expresión de los antígenos Caspr2, DCC y UNC5A tal vez se encuentre bajo el control de este promotor de la transcripción. Además, las MHC de clase II, que se encontraron preferentemente en zonas de diferenciación medular, reflejaron la existencia de células presentadoras de antígenos cerca de la expresión de estos antígenos neuronales y, por consiguiente, la posibilidad de presentación de estas moléculas a las células T.

## ***DISCUSIÓN***



Los anticuerpos dirigidos contra antígenos localizados en la membrana plasmática de las neuronas inducen una serie de síntomas neurológicos en las encefalitis autoinmunes. La experiencia de diversos grupos de investigación ha permitido desarrollar numerosas técnicas de laboratorio para detectar anticuerpos anti-neuronales en el suero o líquido cefalorraquídeo de los pacientes, entre ellas se encuentran: las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia sobre secciones de cerebro de rata/primate, la inmunocitoquímica sobre neuronas hipocampales vivas y los ensayos basados en células. Las dos primeras técnicas son muy útiles para realizar un *screening* inicial, pero no permiten la identificación de la molécula específica diana de los autoanticuerpos. Otro ejemplo es el radioinmunoensayo que permite detectar anticuerpos dirigidos sobre complejos de canales, pero no puede discriminar entre subgrupos de pacientes con anticuerpos dirigidos frente a distintos componentes de los complejos. Tras realizar el *screening* inicial se debe confirmar el diagnóstico con técnicas altamente específicas. Por esta razón, para comprobar la presencia de anticuerpos específicos dirigidos frente a antígenos de superficie se utilizan los ensayos basados en células, así en las células se expresan los antígenos con una conformación estructural preservada [332].

Las técnicas de inmunoprecipitación y el análisis mediante espectrometría de masas son cruciales para identificar nuevos antígenos neuronales de superficie y desarrollar nuevos ensayos basados en células [332]. En ocasiones, algunos pacientes presentan unas características clínicas que sugieren una etiología autoinmune pero resultan negativos para los test de antígenos de superficie conocidos. En estos casos, si las técnicas de inmunohistoquímica o inmunocitoquímica proporcionan una evidencia de la presencia de anticuerpos se puede tratar de identificar la diana molecular de los mismos. Así, en los últimos años, refinamientos en la metodología de inmunoprecipitación aplicada al estudio de encefalitis autoinmunes han llevado al descubrimiento de anticuerpos

potencialmente patogénicos dirigidos contra epítomos extracelulares de distintas moléculas, como: los receptores sinápticos de la superficie neuronal y los componentes trans-sinápticos [333], entre ellos: los receptores NMDAR, AMPAR, GABA-A y GABA-B, la proteína LGI1, etc [146, 206, 245, 247]. El fenómeno de autoinmunidad sucede como un fenómeno paraneoplásico o idiopático y existen las siguientes características comunes en este grupo de encefalitis autoinmunes:

- Los anticuerpos se dirigen contra epítomos extracelulares accesibles para los anticuerpos.
- La unión de los anticuerpos es visible en células transfectadas con el antígeno diana.
- Los efectos de los anticuerpos son a veces reversibles, por ejemplo, los síntomas clínicos podrían revertirse si se tratan rápidamente y
- Los síntomas de los pacientes son similares a aquellos causados por la alteración farmacológica o genética del receptor o molécula implicada en modelos animales y humanos.
- Los datos actuales indican que los anticuerpos alteran la estructura y función del correspondiente antígeno neuronal [334].

El descubrimiento de estas enfermedades autoinmunes ha cambiado considerablemente la forma de abordar en la actualidad el diagnóstico en casos de: encefalitis límbica, pérdidas de memoria subagudas, convulsiones o movimientos anormales.

Ocasionalmente, estos anticuerpos sirven como biomarcadores clínicos en el diagnóstico, proporcionan una pista sobre un posible tumor subyacente o ayudan en la predicción de la respuesta a inmunoterapia. Por esta razón, el diagnóstico temprano de

estos anticuerpos mediante tests específicos es clave para proporcionar a los pacientes un tratamiento adecuado [335].

El SOM comparte la mayoría de las características clínicas y patológicas de las encefalitis autoinmunes con anticuerpos frente a antígenos de superficie, concretamente:

- La enfermedad se desarrolla rápidamente y puede tener una causa idiopática o paraneoplásica. En los niños la mitad de los casos se asocian con tumores neuroblásticos [166], mientras que en los adultos el tumor más frecuente es el cáncer de pulmón de células pequeñas [165].
- El tratamiento revierte los síntomas neurológicos. Así pues, el tratamiento de la neoplasia produce una mejoría llamativa o la completa resolución, tanto en niños como en adultos [168]. Además, algunos pacientes con SOM responden a tratamientos inmunosupresores, como por ejemplo, la hormona adrenocorticotropa, los corticoesteroides orales o parenterales [172, 178].
- En ocasiones, se produce la regresión espontánea del neuroblastoma o incluso la presencia de infiltrados linfocíticos en los tumores [160, 164, 193], lo que podría indicar una inmunidad antitumoral efectiva.

Sin embargo, el autoantígeno responsable permanece sin dilucidar. Esporádicamente, se han descrito anticuerpos frente a los receptores de: GABA-A, [206] GABA-B [207, 336, 337], NMDAR [209], y GlyR, entre otros [179]. No obstante, estos anticuerpos no son específicos del síndrome neurológico y algunos de estos pacientes tienen síntomas de encefalitis severa en lugar del fenotipo clásico del SOM. Es decir, los anticuerpos podrían no estar relacionados directamente con el SOM. En la actualidad no se sabe con exactitud si estos anticuerpos dirigidos frente a la superficie celular son patogénicos o simplemente indican respuestas inmunitarias complejas.

En los niños con SOM existen algunas evidencias circunstanciales que demuestran la presencia de fenómenos de autoinmunidad humoral, por ejemplo: la unión de IgGs en la superficie de células granulares del cerebelo tras incubarlas con el suero de niños con SOM y neuroblastoma [193]. Sin embargo, estos hallazgos no se replican cuando se utiliza el suero de adultos con SOM idiopático [217]. Los neuroblastomas de los niños con SOM se originan a partir de neuroblastos simpáticos primitivos de la glándula adrenal o de los ganglios simpáticos que no se han diferenciado [338] y presentan algunas características especiales. El 90% de los tumores neuroblásticos asociados con SOM no metastatizan y tienen una buena respuesta al tratamiento oncológico [339]. Además, los neuroblastomas de los niños con SOM presentan algunas aberraciones cromosómicas (1p-, +2p o 11q-), regiones amplificadas con incremento de la señal del oncogen MYCN [339]. La línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y utilizada en el estudio es una sublínea de las células SK-N-SH, obtenida originalmente a partir de una biopsia de la médula ósea de un paciente con un neuroblastoma de origen en ganglios simpáticos adrenérgicos [340]. Esta línea es más homogénea que la línea SK-N-SH y contiene fundamentalmente células tipo neuroblasto (tipo N). Las células SH-SY5Y expresan enzimas de actividad neuronal (tirosina y dopamina hidroxilasas), captación de noradrenalina, expresa neurofilamentos, receptores opioides, muscarínicos y receptores de factores de crecimiento neuronal [341]. La línea SH-SY5Y también posee características de células madre y son capaces de diferenciarse bajo numerosos agentes en un fenotipo maduro funcional, por ejemplo: el ácido retinoico induce una diferenciación hacia un fenotipo colinérgico [342]. A pesar de que los tumores de niños SOM también tienen un origen en células inmaduras o neuroblastos primitivos de los ganglios simpáticos, la línea SH-SY5Y presenta algunas diferencias respecto al neuroblastoma observado en pacientes con SOM. A diferencia de los tumores asociados

con SOM, que raramente metastatizan, la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y se trata de un tumor altamente metastásico [343]. Sin embargo, se eligió esta línea debido a que estudios previos demostraron que los sueros de niños con SOM, ataxia y neuroblastoma tenían IgGs capaces de unirse al citoplasma y núcleo de líneas de células de neuroblastoma (SK-N-SH, CHP 100, SH-SY5Y o NMB), incluso la exposición con las IgGs de los pacientes tenía efectos de lisis independiente de complemento, lo que apoya hipótesis de un componente humoral en la patogénesis del SOM [191, 194].

En nuestro estudio los niños con SOM y neuroblastoma también presentaron unión IgG frente al citoplasma de las células de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5H, pero no fuimos capaces de demostrar por inmunofluorescencia la unión de IgG o IgM frente a la superficie celular de la línea SH-SY5Y sin permeabilizar. Teóricamente, el uso de neuronas sin permeabilizar permite detectar anticuerpos en el suero o líquido cefalorraquídeo de los pacientes, dirigidos frente a epitopos extracelulares y evita el efecto del fijador sobre la antigenicidad de receptores [344]. Sin embargo, para comprobar si la reactividad observada en células permeabilizadas se encontraba también en la superficie celular, se empleó la microscopía electrónica y la técnica de inmunoro *post-embedding*. Esta técnica nos permitió observar la localización subcelular de dicha reactividad y seleccionar sueros de pacientes, con reactividad frente a la membrana externa de las células de neuroblastoma SH-SY5Y, útiles para los experimentos de inmunoprecipitación. Las técnicas de microscopía electrónica se han usado en otros estudios de pacientes con síndromes neurológicos para localizar la unión de autoanticuerpos en la superficie celular, por ejemplo, los anticuerpos anti-Tr producen un punteado característico de la capa molecular y el citoplasma de las células de Purkinje en inmunofluorescencia sobre secciones de cerebelo de rata, mientras que por microscopía electrónica se comprobó que se correspondía con el citosol y superficie

externa del retículo endoplásmico de neuronas de la capa molecular y dendritas de las células de Purkinje [345].

En primer lugar, hay que tener en cuenta que uno de los límites de las técnicas de inmunoprecipitación para la detección de moléculas de superficie es que las proteínas de membrana tienen una menor abundancia relativa respecto a las proteínas citosólicas.

Aparte de que ocasionalmente la rotura proteolítica es ineficiente durante el proceso de lisis celular, ya que los dominios hidrofóbicos de las proteínas de membrana tienden a agregarse entre sí fácilmente. Una solución para facilitar el análisis del proteoma de membrana es el enriquecimiento bioquímico mediante fraccionamiento subcelular [346]. Un trabajo previo evidenció la densidad postsináptica como una posible fuente de antígenos en los pacientes con SOM [200]. Por ello, se realizaron los estudios de inmunoprecipitación con extractos de proteínas del SNC de rata y con fracciones enriquecidas en sinaptosomas. El enriquecimiento subcelular por un lado reduciría la detección de proteínas inespecíficas nucleares y citosólicas, y por otro lado, los sinaptosomas contienen proteínas de la membrana pre-sináptica y post-sináptica [297]. Antes de realizar los estudios de inmunoprecipitación se comprobó la existencia de proteínas pre y post-sinápticas por Western-blot con marcadores específicos y se observó que los sinaptosomas utilizados en el estudio, en ocasiones, arrastraban parte de la membrana post-sináptica en los estudios morfológicos por microscopía electrónica. Por tanto, los sinaptosomas resultaban un extracto muy útil para los estudios de inmunoprecipitación con los sueros de pacientes con SOM. Tanto es así que la identificación de los antígenos intracelulares HuB, HuC y KIF 21A, que habían sido previamente descritos en el trabajo que señalaba la densidad post-sináptica como fuente de antígenos de interés [200], nos sirvió como control interno de la metodología empleada. Los anticuerpos anti-Hu son anticuerpos onconeuronales se han asociado

comúnmente con cáncer de pulmón pero también han sido descritos en adultos con SOM con SCLC [347, 348] y en niños con SOM y neuroblastoma [349].

Pese a la falta de correlación entre las características anatómicas de las autopsias de pacientes con SOM, se ha propuesto un mecanismo de alteración de neuronas premotoras en la formación reticular pontina paramediana o rutas descendentes que controlan las neuronas omnipause [186]. Otros autores sugieren que el opsoclonus podría tener su origen en el cerebelo, en concreto en la desinhibición de la región oculomotora del núcleo fastigial [189]. Interesantemente, una de las proteínas de superficie que se identificó, el canal de potasio dependiente de voltaje tipo C Kv3.3, se expresa tanto en el tronco cerebral como en el cerebelo. Los canales de potasio dependientes de voltaje tipo C forman una familia de canales iónicos responsables del restablecimiento del potencial de membrana, la regulación de la liberación de neurotransmisores y la modulación de patrones de descargas de las neuronas. Son proteínas tetraméricas formadas por el ensamblaje de cuatro subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  codificadas por el mismo gen (homotetrámeros) o por productos de diferentes genes (heterotetrámeros) de la misma subfamilia (Kv3.1, 3.2, 3.3 y 3.4). Los genes que codifican para cada subunidad sufren modificaciones post-transcripcionales de *splicing* alternativo, a través de las que se generan 13 proteínas diferentes (Kv3.1a-b, Kv3.2a-d, Kv3.3a-d, Kv3.4a-c) que se diferencian fundamentalmente en la región C-terminal [350]. Los canales de potasio de la subfamilia Kv3 tienen unas características electrofisiológicas únicas que confieren características de descarga rápida a las células que los expresan, ya que los canales tienen una apertura a voltajes próximos a los del reposo [310]. Las diferentes subunidades tienen distinta distribución a lo largo del sistema nervioso, por ejemplo, las subunidades Kv3.3 y Kv3.1b se expresan en interneuronas GABAérgicas y les proporcionan características de neuronas de descarga

rápida [351]. Los péptidos del canal de potasio Kv3.3 que se identificaron comúnmente en los dos experimentos de inmunoprecipitación pertenecían al dominio BTB/POZ, el cuál es responsable de la formación del anillo del canal [352]. La secuencia de este dominio es también altamente similar a la secuencia de aminoácidos del dominio BTB/POZ de la proteína *BTB/POZ domain-containing potassium channel tetramerization domain 7*. Las mutaciones en el gen *KCTD7* que codifica para esta proteína se asocian con un síndrome similar a opsoclonus-mioclonus y ataxia de aparición temprana en humanos [314]. Sin embargo, los ensayos con células incubadas con el suero de pacientes con SOM pediátrico y neuroblastoma resultaron negativos (datos no mostrados).

El modelo genético humano de mutación del gen *KCNC3*, que codifica para la proteína Kv3.3 identificada en los pacientes con SOM, se asocia con el síndrome de ataxia espinocerebelosa autosómica dominante tipo 13 [305]. Los pacientes con esta enfermedad presentan características clínicas comunes con el SOM, por ejemplo, la ataxia cerebelosa y las sacudidas mioclónicas. La ataxia autosómica dominante tipo 13 presenta características clínicas de: marcha atáxica, disartria, otros pacientes tienen nistagmo y signos piramidales. Asimismo, los pacientes con una mutación diferente en el gen *KCNC3* presentan sacudidas mioclónicas [353, 354]. Los estudios de resonancia magnética señalan atrofia pontina y cerebelosa [355], aunque en otros casos estas estructuras son normales [356]. La expresión de los canales Kv3.3 con la mutación de los pacientes con ataxia espinocerebelosa 13 en células de Purkinje de ratón en cultivo induce potenciales de acción y muerte celular debido al aumento de del calcio basal [357]. El modelo animal es muy similar también a la enfermedad humana. El ratón mutante nulo para el gen que codifica para el canal de potasio Kv 3.3 (*Kcnc3*<sup>-/-</sup>) presentó ataxia y espasmos musculares que incluían grupos musculares

de todo el cuerpo [303]. Y los dobles mutantes para los genes que codifican para el canal de potasio Kv3.3 y Kv 3.1 (*Kcnc3*<sup>-/-</sup> /*Kcnc1*<sup>-/-</sup>) desarrollan un fenotipo aún más severo con: ataxia, mioclonía y temblor, dependiendo de los alelos mutados [304]. Las mutaciones en humanos del gen *KCNK1* en un subgrupo de pacientes con ataxia mioclónica progresiva y en pacientes con epilepsia mioclónica progresiva se caracterizan por: ataxia, mioclonus y convulsiones recurrentes, se solapan clínicamente con el SOM [358]. Los estudios de imagen cerebral son normales o con atrofia cerebelosa [359]. Sin embargo, a pesar de su interés no se pudo demostrar la antigenicidad directa frente a la proteína única Kv3.3 o combinaciones de Kv3.3 con otras subunidades (Kv3.1, 3.2 y 3.4) en sueros con SOM (niños o adultos, idiopáticos o paraneoplásicos). La mayoría de laboratorios utilizan células HEK293 en sus ensayos basados en células, ya que son una línea celular que permite la expresión de proteínas de membrana con un plegamiento casi nativo y presentan una maquinaria de biosíntesis de proteínas funcionales superior a *Escherichia coli*, levaduras o células de insectos [360]. Sin embargo, existe una gran controversia respecto al momento de la fijación durante el procedimiento de inmunofluorescencia. En algunos casos, los autoanticuerpos dirigidos frente a canales iónicos y otras proteínas de membrana funcionales no se unen bien a proteínas desnaturalizadas tras la fijación. Por ejemplo, en el caso de anticuerpos anti-NMDAR algunos laboratorios prefieren utilizar células HEK vivas incubadas con el suero o líquido cefalorraquídeo antes de fijarlas y permeabilizarlas [361, 362], pero la comparación entre células fijadas y vivas otorgó una mayor sensibilidad a las células fijadas [149]. Debido a las discrepancias entre las dos técnicas, se realizaron las inmunofluorescencias con las células HEK vivas o fijadas, pero en ningún caso se observó una reactividad clara diferente a la de los controles. Esto podría explicarse en parte debido a que los epítomos podrían no estar

expuestos a los anticuerpos, por la falta de modificaciones post-traduccionales o porque los epitopos antigénicos están incluidos en proteínas accesorias. Como he comentado previamente, en el caso de canales iónicos algunos laboratorios utilizan técnicas de radioinmunoensayo para detectar los anticuerpos, de este modo las proteínas nativas extraídas del tejido nervioso se unen a neurotoxinas específicas marcadas con radioactividad con  $I^{125}$  o  $S^{35}$ . Así, en el caso del síndrome miasténico de Lambert-Eaton, los autoanticuerpos frente VGCCs se detectan con  $\omega$ -conotoxina- $I^{125}$  [363]. Sin embargo, esta técnica no demuestra la antigenicidad directa frente a esta proteína, ya que no se puede descartar la unión con proteínas accesorias. Esto se ha visto por ejemplo en el caso de los VGKCs, donde los anticuerpos, previamente atribuidos a la unión con estos canales, finalmente estaban dirigidos frente a moléculas accesorias del complejo: Caspr2 y LGI1 [245, 247]. Además, en el caso de la familia de los canales de potasio Kv3 no existen neurotoxinas específicas identificadas. Por ejemplo, la neurotoxina de la anémona de mar *Anemonia sulcata* denominada *blood depressing substance I* interacciona con Kv3.4 pero también se une a Kv3.2 y 3.1 [364].

Los canales de potasio dependientes de voltaje participan en la regulación de la excitabilidad de membrana, controlando el potencial de membrana en reposo [365], la tasa de disparo espontánea [366], la propagación de potenciales de acción [367], la liberación de neurotransmisores [368], incluso la apoptosis [369]. Por tanto, la pérdida de la función de los canales Kv3 podría alterar las propiedades de las neuronas con una tasa de disparo rápido (en el caso de Kv3.1, 3.3 afectaría especialmente a las interneuronas GABAérgicas), la liberación de neurotransmisores e incluso podría inducir muerte celular. Es necesario enfocar los estudios futuros hacia las rutas moleculares en las que participan estos canales, por ejemplo, la despolarización por

potasio también produce un aumento de la fosforilación vía ERK-1/2 de manera similar a la observada al exponer sueros SOM con células granulares de cerebelo [216]. Es posible que los epítomos antigénicos se relacionen con subunidades accesorias o reguladoras, que dependan de modificaciones post-transcripcionales o que sean moléculas que interaccionan con estos canales iónicos modificando los patrones de disparo, como, los receptores acoplados a proteínas G que regulan su actividad. Varios grupos están enfocando sus esfuerzos para definir el papel fisiológico de las subunidades accesorias de los canales Kv para generar canales neuronales nativos. Así, estudios de inmunoprecipitación de Kv4.2 han encontrado subunidades accesorias muy interesantes, como: la DPP 6 o la subunidad del receptor GABA Gabra-6 [370].

En el caso del SOM en adultos idiopáticos se identificó un autoantígeno relacionado con otra enfermedad autoinmune, la *selenium-binding protein 1* en pacientes con síndrome de Behçet [371]. Entre las proteínas de superficie que se identificaron resulta interesante la proteína UNC13A, ya que en *Drosophila melanogaster* se encuentra a 70nm de canales de calcio y parece que podría tener un papel importante en el control de la liberación de vesículas sinápticas dependientes de calcio [372, 373]. Sin embargo, no existe ningún fenotipo mutante o de alteración farmacológica relacionado con la enfermedad objeto de estudio.

A pesar de las limitaciones de la técnica de inmunoprecipitación, no debería descartarse la posibilidad de la existencia de antígenos diferentes que contribuyan al SOM en niños y adultos, ya que se ha especulado sobre la existencia de distintas rutas inmunopatogénicas entre el SOM de niños y adultos [200, 214]. No se identificó ninguna proteína común entre niños y adultos con SOM. Esto podría explicarse porque el antígeno o antígenos responsables podrían tener una abundancia relativa baja, estar expresado/s en áreas muy específicas del SNC o que no se hubiese/n solubilizado

correctamente. Otra posibilidad que no se debe descartar, es que quizás el SOM no sea un síndrome mediado por anticuerpos, sino por otros mecanismos inflamatorios. Por tanto, los estudios inmunológicos futuros en esta enfermedad deberían utilizar métodos diferentes a los empleados en el estudio de encefalitis autoinmunes con anticuerpos frente antígenos de superficie [179].

En la NMT la etiología autoinmune se sospecha, entre otras evidencias por: su asociación con otras enfermedades autoinmunes, la respuesta a inmunoterapia y los estudios *in vivo* de transferencia de IgGs [240]. Aproximadamente, la mitad de los casos de pacientes con NMT inmunoprecipitaron VGKCs por radioinmunoensayo con dendrotoxina-I<sup>125</sup> [241]. Algunos autores describieron la presencia de anticuerpos contra subtipos de VGKCs Kv1 en los sueros de pacientes con NMT, síndrome de Morvan o encefalitis límbica sin manifestaciones periféricas. Y que los anticuerpos colocalizaban con las proteínas Kv1.1 y Kv1.2 en regiones juxtapanodales de axones mielinizados y con Kv1.6 en células de Purkinje y neuronas motoras e hipocampales en los pacientes con NMT o síndrome de Morvan [374]. No obstante, esta reactividad previamente atribuída a VGKCs en un subgrupo de pacientes, se demostró que en realidad está dirigida contra una proteína que forma parte del complejo VGKCs: la proteína Caspr2. Los pacientes con NMT tienen una antigenicidad directa contra Caspr2, por ejemplo, si los sueros se preabsorben con Caspr2 la reactividad sobre nervios abole [247].

Los pacientes con MG y timoma (con o sin NMT) presentan diversos autoanticuerpos, por ejemplo, en ocasiones, presentan anticuerpos que reaccionan contra epitopos de proteínas musculares, por ejemplo: los anticuerpos anti-titina [375] o los anticuerpos anti-receptor de rianodina [376]. Todos los pacientes estudiados con MG y timoma (con o sin NMT) que se utilizaron en el estudio tenían anticuerpos anti-AChR y algunos

también tenían anticuerpos dirigidos contra proteínas musculares o nucleares. El suero de los pacientes con MG y anticuerpos anti-AChRs positivos tiene reactividad frente a la membrana post-sináptica de la unión neuromuscular [377], al igual que sucedió cuando incubamos el suero de nuestros pacientes con uniones neuromusculares de ratón. Sin embargo, no se observó ninguna reactividad al incubar las uniones neuromusculares de ratón con el suero de pacientes con NMT aislada, por lo que no pudimos corroborar la hipótesis de la existencia de anticuerpos dirigidos contra la membrana de la terminal pre-sináptica en estos pacientes. Los pacientes con anticuerpos dirigidos contra proteínas musculares tenían también reactividad frente al músculo estriado.

Los anticuerpos anti-Caspr2 son frecuentes en pacientes con NMT, se detectan en aproximadamente un 20% de los casos [256], aunque existe una gran diversidad de presentaciones clínicas en los pacientes con anticuerpos anti-Caspr2. A diferencia de otros síndromes neurológicos clásicos, la NMT se asocia con cáncer con baja frecuencia. Como sucede en otros síndromes neurológicos paraneoplásicos, tal vez exista una relación entre el timoma y la presencia de autoanticuerpos. Por esta razón, el subgrupo de pacientes con NMT y timoma que se utilizaron en este estudio es un subgrupo especial para el estudio de otros posibles autoanticuerpos que pudiesen estar relacionados con la NMT, ya que la tolerancia central y periférica en estos casos podría estar comprometida.

Nuestro estudio señaló una fuerte asociación entre la combinación de anticuerpos anti-Caspr2 y los receptores de Netrina-1 (DCC y UNC5A) y la autoinmunidad neuromuscular desencadenada por el timoma, a veces con síntomas en el SNC (síndrome de Morvan). De forma análoga, en un estudio previo los pacientes con síndrome de Morvan y anticuerpos anti-Caspr2 se asociaba con timoma (con o sin MG)

[248]. En otro estudio reciente, los anticuerpos anti-DCC se encontraron en siete pacientes con síndrome de Morvan y cuatro con encefalitis límbica. La mayoría de ellos tenían timoma y también coexistían con anticuerpos anti-Caspr2 o LGI1 [263].

Analogamente a los anticuerpos anti-SOX1 en pacientes con el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, capaces de predecir la presencia de un cáncer de pulmón de células pequeñas [80], nuestro estudio apuntó hacia que los anticuerpos anti- receptores de Netrina-1 eran biomarcadores de la presencia de timoma en un subgrupo de pacientes con NMT.

La Netrina-1 es una proteína implicada en el proceso de guía de axones durante el desarrollo del sistema nervioso, a través de su interacción con sus dos receptores principales: DCC y UNC5A (receptores de atracción o repulsión respectivamente).

Interesantemente, los receptores de Netrina-1 también se expresan en el sistema nervioso adulto donde tienen otras funciones diferentes, por ejemplo: la plasticidad del SNC [378], o las interacciones de las células de Schwann-axón en la región paranodal de nervios mielinizados [379]. Los ratones mutantes para *Dcc* presentan a nivel del SNC anomalías en la región paranodal y alteraciones en la distribución de Caspr y los canales de sodio y potasio [380]. Los estudios futuros deberían abordar si los anticuerpos anti- receptores de Netrina-1 tienen un efecto patogénico directo sobre sus dianas.

Dos trabajos previos han contribuido a definir clínicamente el perfil de los pacientes con autoinmunidad anti-Caspr2 [250, 381]. Los dos síndromes más frecuentes incluyen: la encefalitis límbica (raramente asociada con cáncer) y el síndrome de Morvan (frecuentemente asociado con un timoma maligno). Los anticuerpos anti-Caspr2 en nuestro estudio de pacientes con NMT eran predictores de la presencia de un timoma. Interesantemente, se identificaron sólo dos pacientes en nuestra serie con anticuerpos

anti-Caspr2 y encefalitis límbica sin timoma, enfatizando aún más que las encefalitis con anticuerpos anti-Caspr2 normalmente no tienen un tumor subyacente [247].

Los pacientes con NMT seropositivos de este estudio estaban confinados al grupo de pacientes con timoma. Esto contrasta con trabajos previos, en los cuales la positividad de anticuerpos no estaba segregada a los casos con timoma [256]. Además, solamente un paciente con NMT aislada sin timoma tenía anticuerpos anti-Caspr2. Existe la posibilidad de que otros anticuerpos desconocidos estén relacionados con la hiperexcitabilidad axonal en estos pacientes. En este estudio se utilizaron únicamente sinaptosomas de SNC de rata para los experimentos de inmunoprecipitación, este aspecto es importante para futuras investigaciones, ya que es concebible que se hayan podido perder antígenos de interés expresados exclusivamente en el sistema nervioso periférico.

El timo, como hemos visto previamente, es un órgano central para el mantenimiento de la autotolerancia, ya que en él ocurren la maduración y selección de células T y la producción de células T reguladoras que mantienen la tolerancia en la periferia. Los timomas son neoplasias de células epiteliales tímicas que se asocian con una gran variedad de enfermedades autoinmunes. Entre las enfermedades neurológicas paraneoplásicas más frecuentes se encuentran: la MG, la NMT adquirida, las encefalitis, el síndrome de Morvan y la miositis. Existe una clara relación entre el síndrome neurológico paraneoplásico y el timoma, ya que el empeoramiento del síndrome neurológico paraneoplásico suele ir acompañado de la recurrencia del timoma [382]. Y, en algunos casos, aunque se elimine el timoma por completo se desarrolla la enfermedad, por ejemplo, entre un 1% de los pacientes la resección del timoma conlleva la aparición posterior de MG [383]. Por tanto, la aparición del timoma parece suficiente para desencadenar una enfermedad autoinmune.

Los timomas normalmente tienen un contenido de linfocitos y células epiteliales variable que permite su clasificación histológica. A pesar de la controversia en cuanto a la clasificación histológica de los timomas [384, 385], la nueva clasificación de la OMS utilizada en este estudio es reconocida internacionalmente debido a su valor pronóstico y reproducibilidad [386]. Los timomas se clasifican principalmente en seis tipos: A, AB, B1, B2, B3 y C o carcinomas tímicos. El tipo A deriva de la médula, el tipo B deriva de la corteza y el tipo AB es un tipo mixto. Los timomas tipo B (derivados de la corteza) se subdividen en B1, B2 o B3 dependiendo del porcentaje de linfocitos y el grado de atipia celular. Los timomas de tipo B son los más frecuentes en los pacientes con MG, siendo el tipo B2 el más frecuente seguido de los tipos B3, B1, AB [387, 388]. En nuestra serie de estudio, los timomas tipo B también eran los más frecuentes en los pacientes con MG (con o sin NMT), siendo también el B2 el subtipo más frecuente dentro de ellos y en menor frecuencia B1, B3. Coincidiendo con estudios previos, los timomas tipo A eran los menos frecuentes. En ocasiones, es difícil establecer comparaciones con estudios previos de otros grupos, dado que en muchos estudios siguen otras clasificaciones o los tipos se clasifican como mixtos A-AB, B2-B3 [388]. Además, hay que tener en cuenta que todos los pacientes con MG y timoma estudiados recibieron un tratamiento con esteroides previo a la timectomía. Este tratamiento elimina principalmente timocitos inmaduros [389] y por tanto podría modificar la histología del timoma.

Los timomas B2, B3 estudiados eran moderadamente malignos con estadíos de Masaoka más frecuentes II y III, mientras que los timomas tipo A, B1 se detectaron en estadíos I ó II, esto también coincide con otros estudios previos [272, 388]. Algunos autores sugieren que la MG se asocia con un peor pronóstico del timoma, ya que los timomas B2 sin asociaciones autoinmunes suelen presentarse más tarde. Sin embargo,

actualmente no existen evidencias de que la autoinmunidad afecte al crecimiento del tumor, como si que ocurre por ejemplo, en pacientes con síndrome miasténico de Lambert-Eaton donde las reacciones autoinmunes retardan el crecimiento del SCLC [272, 390].

En nuestro estudio la clasificación de la MG al debut era independiente del tipo histológico del tumor y del estadio de Masaoka. A diferencia de otros tumores, en el caso del timoma, la MG puede aparecer en cualquier estadio del tumor.

Los timomas de tipo B derivan de la corteza, esto guarda una estrecha relación también con estudios previos en los que los timomas de pacientes con MG se describen con una médula ausente o rudimentaria [272]. Esto es especialmente importante, ya que en la médula es donde sucede el proceso de selección negativa de células T autorreactivas y la generación de células T reguladoras. Los corpúsculos de Hassall se definen como el grado máximo de diferenciación epitelial en el timoma, además expresan moléculas neuroendocrinas (cromogranina A, sinaptofisina, etc) y moléculas de presentación de antígenos MHC de clase II [391]. En la mayoría de los pacientes con MG y timoma estudiados los corpúsculos de Hassall estaban ausentes, independientemente del tipo histológico, al igual que se ha visto en estudios previos [272]. A pesar de que su función todavía no es muy conocida, se ha propuesto que pueden participar en la eliminación de timocitos apoptóticos [392] y en la activación células dendríticas para la generación de células T reguladoras  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ , a través de la producción de linfopoyetina estromal tímica [393], por tanto la ausencia de estas estructuras podría estar directamente relacionada con la pérdida tanto de la tolerancia central como periférica.

El timo, pese a ser un órgano linfóide primario, puede ser invadido por tejido linfóide y convertirse en un sitio de inmunización. En pacientes jóvenes con MG, el timo

normalmente tiene centros germinales y células plasmáticas capaces de producir anticuerpos anti-AChR. En los timomas también pueden existir infiltrados perivasculares, incluso centros germinales [394]. Algunos autores han observado que las células T CD4<sup>+</sup> foliculares colaboradoras de los pacientes con MG interaccionan con células B e inducen la producción de autoanticuerpos anti-AChR [395]. Nuestros pacientes presentaron un % mayor del área ocupada por células B intratumorales en el grupo de los pacientes con MG y timoma. Esto es especialmente importante ya que podrían interaccionar con células T, como se ha visto en cultivos celulares, y que estas les induzcan a la formación de autoanticuerpos a través de la producción de citoquinas.

Para un correcto proceso de maduración y selección de células T, además de una arquitectura tímica normal, se requiere la expresión de otras proteínas: AIRE, un factor de transcripción que contribuye a la expresión promiscua de antígenos tejido-específicos; MHC de clase II, para presentar antígenos a las células T CD4<sup>+</sup>; y FOXP3, relacionado con la maduración de células T reguladoras y el mantenimiento de la tolerancia en la periferia. La afinidad de las interacciones entre el receptor de células T y las MHC en las células epiteliales tímicas determinan la maduración o eliminación de células T. Se han descrito alteraciones en la expresión de MHC de clase II en células epiteliales en pacientes con autoinmunidad [396], esto podría comprometer el proceso de selección negativa de células T. En nuestra serie, existían evidencias estadísticas para confirmar la diferencia entre medias del área relativa ocupada por células epiteliales CKAE1/AE3<sup>+</sup> y las moléculas MHC de clase II en los pacientes con MG y timoma respecto a individuos sanos. Esto podría coincidir con los datos previos respecto a un cambio en la expresión de las MHC de clase II [397]. Según la hipótesis de afinidad-avidez [398], una reducción de las MHC de clase II podría provocar una selección incorrecta de células T que en condiciones normales habrían sido eliminadas. El gen

*AIRE* se relaciona con la autoinmunidad debido a que mutaciones en este gen provocan dos enfermedades autoinmunes: la poliendocrinopatía con candidiasis y distrofia ectodérmica y el síndrome de poliendocrinopatía tipo 1 [399, 400]. La relación entre el factor de transcripción *AIRE* y el desarrollo de MG surgió tras la observación de bajos niveles del transcrito del gen *CHRNA* (que codifica para el AChR) en células epiteliales medulares tímicas aisladas de un ratón deficiente en *Aire* [401]. Además, los timomas de pacientes con MG presentaron también una reducción en la expresión de *AIRE* [402]. Pese a que la variable de grupo y *AIRE* eran independientes en nuestra serie de pacientes, existía una proporción de casos sin expresión del gen *AIRE* en los timomas de los pacientes con MG respecto a los controles (el 40% de los timomas frente a un 25% de los timos sanos no expresaron la proteína *AIRE*). *AIRE* contribuye a la expresión ectópica de antígenos tejido-específicos en las células epiteliales medulares tímicas. El desequilibrio en la expresión de antígenos locales, en un microambiente deficiente para la expresión de *AIRE*, podría favorecer la selección de células T autorreactivas [272]. Alternativamente, podría provocar un desequilibrio a nivel periférico al dirigir el linaje de células T a células T reguladoras [403]. Conviene destacar que en todos los pacientes con timoma seropositivos estudiados, expresaron los antígenos neuronales en células tímicas estromales y *AIRE*. La presencia de *AIRE* en estos pacientes es un argumento en contra de que la pérdida de la expresión del gen *AIRE* favorece la autoinmunidad. Las células epiteliales tímicas medulares *AIRE*<sup>+</sup> representan el grado máximo de diferenciación, estas células expresan altos niveles de CD80 y MHC de clase II [404]. Aunque las células tímicas medulares expresan MHC de clase II, la presentación de antígenos se lleva a cabo principalmente por células dendríticas. Según estudios recientes, *AIRE* también es capaz de contribuir en el proceso de selección de células T facilitando la transferencia del antígeno de las células epiteliales tímicas

medulares a las células dendríticas que expresan MHC de clase II para su presentación [405]. Otro mecanismo que podría relacionarse con la aparición de autoinmunidad en estos pacientes es que las células medulares AIRE<sup>+</sup> seleccionan la población de células T reguladoras FOXP3<sup>+</sup>. Así, por ejemplo, la expresión transgénica de un neo-autoantígeno controlado por AIRE selecciona células T reguladoras específicas [406]. Sin embargo, la contribución de AIRE a la tolerancia periférica todavía no se conoce con exactitud. Para evaluar que mecanismo es fisiológicamente más relevante se requiere más investigación en el futuro. FOXP3 es un factor de transcripción específico necesario para la diferenciación y desarrollo de células T reguladoras y se utiliza como marcador específico de estas células [407]. Sin embargo, no existió una dependencia entre las variables FOXP3 y el grupo estudiado, aproximadamente en el 60% de los timomas estudiados y en el 80% de los timos sanos no se observaron células FOXP3<sup>+</sup> en el tejido tímico. Una limitación de nuestro trabajo es que no se estudió la población de células T reguladoras en la periferia y únicamente se evaluó la expresión de todos los marcadores mediante inmunohistoquímica dentro del tumor.

Las células mioides de pacientes con MG son positivas para los AChR y moléculas de presentación de antígenos HLA-DR [408]. Sin embargo, los datos de nuestro estudio apuntan hacia que las células T no tolerantes reaccionan preferentemente con dianas musculares en la periferia. Al igual que en estudios previos, en los timomas de nuestros pacientes las células mioides estaban ausentes (salvo en un caso) [272] y el 75% de estos casos presentaron anticuerpos frente antígenos musculares, independientemente del tipo histológico del timoma.

La mayoría de los síndromes neurológicos paraneoplásicos con antígenos onconeuronales aparecen en etapas tempranas de la enfermedad oncológica, los tumores expresan los antígenos onconeuronales y el pronóstico mejora después del tratamiento

del tumor subyacente. La inmunidad asociada con el timoma difiere en algunos aspectos de este modelo clásico. En nuestro estudio la inmunidad frente a Caspr2 y receptores de Netrina-1 aparecía en estadios avanzados de Masaoka con metástasis, frecuentemente en pacientes ya diagnosticados de MG y timoma. La timectomía, quimioterapia o recurrencia del timoma han sido previamente observados como desencadenantes de la inmunidad asociada a Caspr2 [248, 266]. En nuestros pacientes se comprobó la expresión de los receptores de Netrina-1, Caspr2 en las tres muestras de timoma disponibles. Los hallazgos de este estudio son consistentes con los estudios previos en los que observa la expresión de epítomos de antígenos implicados en la inmunidad paraneoplásica (CRMP5, titina, AChRs) [409, 410]. A pesar de tener un significado patogénico incierto, ya que la titina es un antígeno intracelular, los anticuerpos anti-titina son marcadores de timoma en pacientes con una edad de debut de la MG menor a 50 años [411]. Es muy posible que la expresión de los antígenos en un microambiente anormal sea importante en el desarrollo de autoinmunidad combinada frente a Netrina-1 y Caspr2 y contribuya a la selección intratumoral de células T y su activación. Futuros estudios deberían enfocarse en determinar la patogenicidad de estos anticuerpos y confirmar con grandes series de pacientes la utilidad potencial como biomarcador de la presencia de un timoma subyacente en pacientes con enfermedades asociadas con anticuerpos anti-Caspr2.



## ***CONCLUSIONES***



1. En los estudios de microscopía electrónica, la presencia de depósitos de IgG en la superficie de células de neuroblastoma incubadas con el suero de pacientes con síndrome opsoclonus-mioclonus, apoya la hipótesis de un origen autoinmune de este síndrome.
2. El canal de potasio dependiente de voltaje de tipo Kv3.3 es un candidato antigénico en el síndrome opsoclonus-mioclonus. Debido a que no se ha podido demostrar una antigenicidad directa de este canal, los estudios futuros deben explorar proteínas asociadas o la posible influencia de las modificaciones post-traslacionales en su antigenicidad.
3. A pesar de que nuestro estudio ha empleado técnicas altamente sensibles en la detección de anticuerpos, no ha sido posible identificar un antígeno común en pacientes con el síndrome opsoclonus-mioclonus. Alternativamente, este hecho podría ser explicado bien porque la enfermedad no está mediada por anticuerpos, o bien porque existen rutas inmunopatogénicas diferentes.
4. Los receptores de Netrina-1 (DCC y UNC5A) son nuevos autoantígenos de superficie celular en pacientes con neuromiotonía asociada a timoma y miastenia gravis.
5. En la práctica clínica, la presencia de los anticuerpos anti-receptor de Netrina-1 y anti-Caspr2 en pacientes con neuromiotonía apoyan el origen autoinmune de los síntomas y predicen la presencia de un timoma. Los pacientes que presentan simultáneamente anticuerpos anti-receptor de Netrina-1 y anti-Caspr2 frecuentemente presentan síntomas adicionales de afectación del SNC (síndrome de Morvan).

6. Debido a las funciones biológicas que en el individuo adulto presentan los receptores de Netrina-1 (plasticidad sináptica en SNC, interacción celular en regiones paranodales de fibras mielínicas del sistema nervioso periférico) los anticuerpos anti-Netrina-1 podrían tener un papel patogénico en el origen de los síntomas de los pacientes.
  
7. A diferencia de los síndromes paraneoplásicos clásicos, la inmunidad anti-receptor de Netrina-1 y anti-Caspr2 que desarrollan los pacientes con timoma ocurre en pacientes en estadios oncológicos avanzados. La expresión en el timoma de los antígenos parece un paso importante en la rotura de tolerancia inmune en estos pacientes. La presencia de AIRE en los tumores de nuestros pacientes es un argumento en contra de la hipótesis de pérdida de expresión de esta proteína como paso clave para el desarrollo de autoinmunidad.

## ***TABLAS ANEXAS***



**Tabla A1.** Drogas o toxinas asociadas con el Opsoclonus<sup>1</sup> o Mioclonus<sup>2</sup>. Adaptada desde [160].

Sustancia	Referencia
Alcanfor <sup>2</sup>	[412]
Alcohol <sup>2</sup>	[413]
Amitriptilina <sup>1,2</sup>	[414, 415]
Anfetaminas <sup>2</sup>	[413]
Apresolina <sup>2</sup>	[413]
Bemegrida <sup>2</sup>	[412]
Benzamidas <sup>2</sup>	[416]
Biguanidas <sup>2</sup>	[413]
Boratos <sup>2</sup>	[413]
Bromuro de metilo <sup>2</sup>	[417]
Buflomedil <sup>2</sup>	[418]
Carbamazepina <sup>2</sup>	[419]
Cefmetazol <sup>2</sup>	[420]
Cicloserina <sup>2</sup>	[412]
Clomipramina <sup>2</sup>	[421]
Cloralosa <sup>2</sup>	[422]
Clorambucilo <sup>2</sup>	[423]
Clordecona <sup>1,2</sup>	[424]
Cocaína <sup>1,2</sup>	[425]
Codeína <sup>2</sup>	[413]
Dextropropoxifeno <sup>2</sup>	[413]
Diazepam <sup>1</sup>	[426]
DTT <sup>1,2</sup>	[427]
Enflurano (anestesia) <sup>2</sup>	[428]
Estricina <sup>2</sup>	[429, 430]
Etilen glicol <sup>2</sup>	[413]
Etomidato (anestesia) <sup>2</sup>	[431]
Fenciclidina <sup>2</sup>	[432]
Fenelzina <sup>2</sup>	[426]
Fenitoína <sup>1,2</sup>	[426]
Fenol <sup>2</sup>	[412]
Fentanil <sup>2</sup>	[413]
Fluoroacetato <sup>2</sup>	[412]
Hidrazidas <sup>2</sup>	[431]
Imipromina <sup>2</sup>	[433]
Insulina <sup>2</sup>	[413]
Isoniazida <sup>2</sup>	[413]
L-dopa (pacientes con Parkinson) <sup>2</sup>	[413]
Litio-haldo <sup>1</sup> /Litio <sup>2</sup>	[434-436]
Mentol <sup>2</sup>	[413]
Mercurio y sus sales <sup>2</sup>	[437]
Metaldehído <sup>2</sup>	[413]
Metacualona <sup>2</sup>	[438]
Metoclopramida <sup>2</sup>	[439]
Morfina <sup>2</sup>	[412]
Naloxona <sup>2</sup>	[413]
Nicotina <sup>2</sup>	[413]
Niquetamida <sup>2</sup>	[413]
Norpetidina <sup>2</sup>	[440]
Organofosfatos <sup>1,2</sup>	[441]
Paradiclorobenceno <sup>2</sup>	[413]
Penicilina <sup>2</sup>	[440]
Pentetrazol <sup>2</sup>	[430]
Picrotoxina <sup>2</sup>	[413]
Piperazina <sup>2</sup>	[442]
Plomo <sup>2</sup>	[437]
Propfenona <sup>2</sup>	[443]
Sales de bismuto <sup>2</sup>	[444]
Santonina de sodio <sup>2</sup>	[437]
Sufentanilo <sup>2</sup>	[445]
Sulfamidas <sup>2</sup>	[413]
Talio <sup>1</sup>	[446]
Teofilina <sup>2</sup>	[413]
Tolueno <sup>1</sup>	[447]
Tris (hidroximetil) aminometano <sup>2</sup>	[413]

**Tabla A2.** Etiologías infecciosas asociadas con *Opsoclonus*<sup>1</sup> o *Mioclonus*<sup>2</sup> Adaptada desde [160].

Agente	Referencias
Adenovirus <sup>1,2</sup>	[448]
<i>Borrelia burgdorferi</i> <sup>1,2</sup>	[449]
Citomegalovirus (CMV) <sup>1,2</sup>	[450]
Enterovirus (Coxsackie B virus) <sup>1,2</sup>	[451, 452]
Meningitis tuberculosa <sup>1</sup>	[453, 454]
Meningitis por <i>Hemophilus influenzae</i> <sup>1,2</sup>	[455, 456]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <sup>1,2</sup>	[179]
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <sup>1,2</sup>	[457]
<i>Leptospira sp.</i> <sup>1,2</sup>	[458]
Parotiditis <sup>1</sup>	[459]
<i>Plasmodium sp.</i> <sup>1</sup>	[460]
Polioencefalitis <sup>1</sup>	[461]
Psitacosis <sup>1</sup>	[462]
Rubéola <sup>1</sup>	[463]
<i>Salmonella typhi</i> <sup>1</sup>	[464]
<i>Streptococcus sp.</i> <sup>1,2</sup>	[465]
Virus de Epstein-Barr (EBV) <sup>1,2</sup>	[466]
Virus del Dengue (DENV) <sup>1,2</sup>	[467, 468]
Virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV) <sup>1,2</sup>	[469, 470]
Virus de la Hepatitis B y C <sup>1,2</sup>	[471]
Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) <sup>1,2</sup>	[472, 473]
Virus del Nilo occidental (WNV) <sup>1,2</sup>	[474]
Virus Influenza (IFV) <sup>1,2</sup>	[475]

También se han descrito casos de SOM tras la inmunización (vacunas) [476].

**Tabla A3.** Tumores asociados con *Opsoclonus*<sup>1</sup> o *Mioclonus*<sup>2</sup>. Adaptada desde [160].

Tumor primario	Referencia
Adenocarcinoma de las trompas de falopio	[477]
Adenocarcinoma de páncreas	[478]
Carcinoma anaplásico de vejiga	[479]
Carcinoma de células escamosas de esófago	[175]
Carcinoma de células escamosas de faringe	[480]
Carcinoma de estómago <sup>1,2</sup>	[179]
Carcinoma de riñón <sup>1,2</sup>	[481, 482]
Carcinoma de útero <sup>1,2</sup>	[483]
Carcinoma nasofaríngeo	[484]
Carcinoma orofaríngeo	[179]
Cerebro	
Ganglioneuroblastoma*	[485, 486]
Ganglioneuroma	[487]
Glioblastoma	[488]
Neuroblastoma*	[489-496]
Oligoastrocitoma	[477]
Condrosarcoma	[497]
Hepatoblastoma* <sup>1,2</sup>	[498-500]
Linfoma no-Hodgkin y Hodgkin <sup>1,2</sup>	
Mama	
Adenocarcinoma <sup>1,2</sup>	[204]
Carcinoma ductal infiltrante <sup>1</sup>	[203]
Melanoma	[501]
Ovario	
Carcinoma <sup>1,2</sup>	[502]
Teratoma <sup>1,2</sup>	[179, 503]
Pulmón	
De células pequeñas (microcítico)	[504-506]
De no células pequeñas (no microcítico):	[507]
Adenocarcinoma	[508]
Carcinoma indiferenciado	[478]
De células grandes	[509]
Epidermoide	[164]
Timo	
Carcinoma de células escamosas <sup>1</sup>	[510]
Timoma <sup>1,2</sup>	[511]
Seminoma testicular <sup>1,2</sup>	[179]

**Tabla A4. Clasificación histológica de los timomas OMS 2014.** Adaptada de [512].

<b>Tipo histológico</b>	<b>Descripción histológica</b>
Timoma tipo A o medular	Neoplasia epitelial tímica constituida por células tumorales ovas/fusiformes sin o muy escasos linfocitos inmaduros.
Timoma tipo AB o mixto	Neoplasia tímica epitelial constituida por un componente de células fusiformes (tipo A) escasos linfocitos y un componente rico en linfocitos (similar al tipo B), con una población significativa de células T inmaduras
Timoma tipo B1 o rico en linfocitos	Neoplasia tímica epitelial constituida por células epiteliales dispersas inmersas en una matriz rica en linfocitos T inmaduros. Contiene áreas de diferenciación medular.
Timoma tipo B2 o cortical	Tumor rico en linfocitos constituido por células epiteliales neoplásicas poligonales, generalmente en pequeños grupos, en combinación con numerosas células T inmaduras. Puede contener o no áreas de diferenciación medular.
Timoma tipo B3 o epitelial	Tumor predominantemente epitelial constituido por células epiteliales poligonales leve o moderadamente atípicas dispuestas en un patrón de crecimiento difuso. En ocasiones entremezcladas con células T inmaduras no neoplásicas.
Timoma micronodular con estroma linfoide	Tumor tímico epitelial constituido por múltiples nidos de células epiteliales ovas o fusiformes rodeadas por un estroma linfoide que puede contener folículos linfoides.
Timoma metaplásico	Tumor bifásico constituido por áreas sólidas de células epiteliales inmersas en un fondo de células fusiformes sin atipias con transición entre ambos componentes gradual o brusca.
Timoma microscópico	Proliferaciones tímicas multifocales de menos de 1mm de diámetro.
Timoma esclerosante	Tumor con rasgos de un timoma convencional con abundante estroma colágeno.
Lipofibroadenoma	Tumor tímico benigno con un estroma hialino que rodea cordones de células epiteliales sin atipias, adipocitos y escasos linfocitos.
Carcinoma tímico escamoso (previamente Timoma tipo C)	Neoplasia maligna tímica con diferenciación escamosa entremezclada con células T inmaduras.
Carcinoma basaloide	Proliferación de células epiteliales pequeñas o medianas, con elevada relación núcleo/citoplasma, dispuestas en nidos sólidos o estructuras papilares quísticas con empalizada periférica.
Carcinoma mucoepidermoide	Proliferación de células epiteliales malignas de hábito escamoso entremezcladas con células mucosecretoras y celularidad de tipo intermedio.
Linfoepitelioma-like	Carcinoma tímico indiferenciado o escamoso poco diferenciado que se acompaña de un infiltrado linfoplasmocitario prominente.
Carcinoma de células claras	Carcinoma constituido predominantemente o de manera exclusiva por células de citoplasma ópticamente claro.
Carcinoma sarcomatoide	Carcinoma constituido completa o parcialmente por células fusiformes. Si contiene elementos sarcomatosos heterólogos se denomina carcinosarcoma.
Adenocarcinomas	Tumor tímico epitelial maligno con diferenciación glandular y o producción de mucina.
NUT carcinoma	Carcinoma pobremente diferenciado definido genéticamente por la presencia de reordenamiento genético de NUT.
Carcinoma indiferenciado	Carcinoma tímico con rasgos morfológicos e inmunohistoquímicos de diferenciación epitelial tras excluir otros tipos de carcinoma tímico.

**Tabla A5.** *Clasificación de Masaoka del estadio del timoma.* Adaptada desde [302].

Estadio de Masaoka	Criterio
I	Tumor encapsulado.
Ila	Invasión microscópica de la cápsula.
Ilb	Invasión macroscópica del tejido adiposo.
III	Invasión de vasos sanguíneos, pericardio o pulmón.
IVa	Diseminación pleural y/o pericárdica.
IVb	Metástasis linfáticas o hematógenas.

**Tabla A6.** *Clasificación clínica de la Miastenia Gravis según MGFA (Myasthenia gravis foundation of America).* Adaptada desde [513].

Clase	Definición
I	Limitada a la región ocular (cualquier debilidad ocular, posible ptosis).
Ila	Músculos diferentes a los oculares, debilidad ocular de cualquier gravedad. Leve: debilidad con predominio apendicular, axial o ambos.
Ilb	Leve: debilidad de predominio bulbar, respiratorio o ambos.
IIIa	Moderada: debilidad de predominio apendicular, axial o ambos.
IIIb	Moderada: debilidad de predominio bulbar, respiratorio o ambos.
IVa	Grave: debilidad de predominio apendicular, axial o ambos.
IVb	Grave: debilidad de predominio bulbar, respiratorio o ambos.
V	Intubación, con asistencia respiratoria mecánica o sin ella.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



1. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik J. Immunobiology: The immune system in health and disease. New York: Garland Science; 2001.
2. Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc.* 1957;164(13):1439-47.
3. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today.* 1993;14(9):426-30.
4. Mackay IR, Rose N. The autoimmune diseases. 5th ed. San Diego, USA: Academic Press; 2013. p.19-37.
5. De Bock M, Vandembroucke RE, Decrock E, Culot M, Cecchelli R, Leybaert L. A new angle on blood-CNS interfaces: a role for connexins? *FEBS Lett.* 2014;588(8):1259-70.
6. Keir G, Thompson EJ. Proteins as parameters in the discrimination between different blood-CSF barriers. *J Neurol Sci.* 1986;75(3):245-53.
7. Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2005;26(9):485-95.
8. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(9):623-35.
9. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature.* 2015;523(7560):337-41.
10. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol.* 1948;29(1):58-69.
11. Huber AK, Duncker PC, Irani DN. Immune responses to non-tumor antigens in the central nervous system. *Front Oncol.* 2014;4:328.
12. Hampe CS. Protective role of anti-idiotypic antibodies in autoimmunity--lessons for type 1 diabetes. *Autoimmunity.* 2012;45(4):320-31.
13. Sprent J, Kishimoto H. The thymus and central tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1409):609-16.
14. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:571-606.
15. Punt JA, Havran W, Abe R, Sarin A, Singer A. T cell receptor (TCR)-induced death of immature CD4+CD8+ thymocytes by two distinct mechanisms differing in their requirement for CD28 costimulation: implications for negative selection in the thymus. *J Exp Med.* 1997;186(11):1911-22.
16. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):833-44.
17. Malhotra D, Linehan JL, Dileepan T, Lee YJ, Purtha WE, Lu JV, et al. Tolerance is established in polyclonal CD4(+) T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol.* 2016;17(2):187-95.
18. Abramson J, Husebye ES. Autoimmune regulator and self-tolerance - molecular and clinical aspects. *Immunol Rev.* 2016;271(1):127-40.
19. Sakaguchi S, Powrie F, Ransohoff RM. Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. *Nat Med.* 2012;18(1):54-8.
20. Nemazee DA, Burki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature.* 1989;337(6207):562-6.
21. Nemazee D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:19-51.
22. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous

- target cell death. *Immunity*. 2004;21(4):589-601.
23. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008;9(3):239-44.
  24. Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G, Stojanovich L, Cutolo M, Amital H, Levy Y, et al. The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases--2008. *Isr Med Assoc J*. 2008;10(1):8-12.
  25. Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, McFarland HF, et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):9979-84.
  26. Horton R, Gibson R, Coghill P, Miretti M, Allcock RJ, Almeida J, et al. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. *Immunogenetics*. 2008;60(1):1-18.
  27. Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan MA, Selmi C, et al. Twin studies in autoimmune disease: genetics, gender and environment. *J Autoimmun*. 2012;38(2-3):J156-69.
  28. Bogdanos DP, Smyk DS, Invernizzi P, Rigopoulou EI, Blank M, Pouria S, et al. Infectome: a platform to trace infectious triggers of autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2013;12(7):726-40.
  29. Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Infections and autoimmunity--friends or foes? *Trends Immunol*. 2009;30(8):409-14.
  30. Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci*. 2012;15(8):1063-7.
  31. Sfriso P, Ghirardello A, Botsios C, Tonon M, Zen M, Bassi N, et al. Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *J Leukoc Biol*. 2010;87(3):385-95.
  32. Samarkos M, Vaiopoulos G. The role of infections in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(1):99-103.
  33. Janeway CA, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol*. 1998;10(5):349-50.
  34. Albert LJ, Inman RD. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med*. 1999;341(27):2068-74.
  35. McCarthy N, Giesecke J. Incidence of Guillain-Barre syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*. *Am J Epidemiol*. 2001;153(6):610-4.
  36. Godschalk PC, Kuijf ML, Li J, St Michael F, Ang CW, Jacobs BC, et al. Structural characterization of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide outer cores associated with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. *Infect Immun*. 2007;75(3):1245-54.
  37. Ang CW, Endtz HP, Jacobs BC, Laman JD, de Klerk MA, van der Meche FG, et al. *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides from Guillain-Barre syndrome patients induce IgG anti-GM1 antibodies in rabbits. *J Neuroimmunol*. 2000;104(2):133-8.
  38. Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, et al. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(31):11404-9.
  39. Oertelt-Prigione S. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun Rev*. 2012;11(6-7):A479-85.
  40. Selmi C, Brunetta E, Raimondo MG, Meroni PL. The X chromosome and the sex ratio of autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2012;11(6-7):A531-7.
  41. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502-17.

42. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000;343(13):938-52.
43. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med.* 1933;58(1):39-53.
44. Warren KG, Catz I, Johnson E, Mielke B. Anti-myelin basic protein and anti-proteolipid protein specific forms of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1994;35(3):280-9.
45. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med.* 2003;349(2):139-45.
46. Dale RC, Tantsis EM, Merheb V, Kumaran RY, Sinmaz N, Pathmanandavel K, et al. Antibodies to MOG have a demyelination phenotype and affect oligodendrocyte cytoskeleton. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2014;1(1):e12.
47. Kothur K, Wienholt L, Tantsis EM, Earl J, Bandodkar S, Prelog K, et al. B Cell, Th17, and Neutrophil Related Cerebrospinal Fluid Cytokine/Chemokines Are Elevated in MOG Antibody Associated Demyelination. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149411.
48. Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barre syndrome. *Lancet.* 2016;388(10045):717-27.
49. Willison HJ, Veitch J, Paterson G, Kennedy PG. Miller Fisher syndrome is associated with serum antibodies to GQ1b ganglioside. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993;56(2):204-6.
50. Ogino M, Orazio N, Latov N. IgG anti-GM1 antibodies from patients with acute motor neuropathy are predominantly of the IgG1 and IgG3 subclasses. *J Neuroimmunol.* 1995;58(1):77-80.
51. Yuki N, Ichihashi Y, Taki T. Subclass of IgG antibody to GM1 epitope-bearing lipopolysaccharide of *Campylobacter jejuni* in patients with Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol.* 1995;60(1-2):161-4.
52. Buchwald B, Ahangari R, Toyka KV. Differential blocking effects of the monoclonal anti-GQ1b IgM antibody and alpha-latrotoxin in the absence of complement at the mouse neuromuscular junction. *Neurosci Lett.* 2002;334(1):25-8.
53. Ho TW, Willison HJ, Nachamkin I, Li CY, Veitch J, Ung H, et al. Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol.* 1999;45(2):168-73.
54. Ogawara K, Kuwabara S, Mori M, Hattori T, Koga M, Yuki N. Axonal Guillain-Barre syndrome: relation to anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* infection in Japan. *Ann Neurol.* 2000;48(4):624-31.
55. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med.* 1995;333(21):1374-9.
56. Gong Y, Tagawa Y, Lunn MP, Laroy W, Heffer-Lauc M, Li CY, et al. Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. *Brain.* 2002;125(Pt 11):2491-506.
57. Sander HW, Latov N. Research criteria for defining patients with CIDP. *Neurology.* 2003;60(8 Suppl 3):S8-15.
58. Alaedini A, Sander HW, Hays AP, Latov N. Antiganglioside antibodies in multifocal acquired sensory and motor neuropathy. *Arch Neurol.* 2003;60(1):42-6.
59. Cocito D, Isoardo G, Ciaramitaro P, Migliaretti G, Pipieri A, Barbero P, et al. Terminal latency index in polyneuropathy with IgM paraproteinemia and anti-MAG antibody. *Muscle Nerve.* 2001;24(10):1278-82.

60. Querol L, Illa I. Paranodal and other autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2015;28(5):474-9.
61. Dalakas MC. Pathogenesis of immune-mediated neuropathies. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(4):658-66.
62. Yan WX, Taylor J, Andrias-Kauba S, Pollard JD. Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Ann Neurol.* 2000;47(6):765-75.
63. Sanvito L, Makowska A, Mahdi-Rogers M, Hadden RD, Peakman M, Gregson N, et al. Humoral and cellular immune responses to myelin protein peptides in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(3):333-8.
64. Nobile-Orazio E, Giannotta C, Briani C. Anti-ganglioside complex IgM antibodies in multifocal motor neuropathy and chronic immune-mediated neuropathies. *J Neuroimmunol.* 2010;219(1-2):119-22.
65. Mathey EK, Park SB, Hughes RA, Pollard JD, Armati PJ, Barnett MH, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(9):973-85.
66. Stathopoulos P, Alexopoulos H, Dalakas MC. Autoimmune antigenic targets at the node of Ranvier in demyelinating disorders. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(3):143-56.
67. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Diaz-Manera J, Pardo J, Ortega-Moreno A, et al. Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology.* 2014;82(10):879-86.
68. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Martinez-Hernandez E, Diaz-Manera J, Suarez-Calvet X, et al. Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol.* 2013;73(3):370-80.
69. Miura Y, Devaux JJ, Fukami Y, Manso C, Belghazi M, Wong AH, et al. Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain.* 2015;138(Pt 6):1484-91.
70. Doppler K, Appeltshauser L, Wilhelmi K, Villmann C, Dib-Hajj SD, Waxman SG, et al. Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(7):720-8.
71. Labasque M, Hivert B, Nogales-Gadea G, Querol L, Illa I, Faivre-Sarrailh C. Specific contactin N-glycans are implicated in neurofascin binding and autoimmune targeting in peripheral neuropathies. *J Biol Chem.* 2014;289(11):7907-18.
72. Manso C, Querol L, Mekaouche M, Illa I, Devaux JJ. Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects. *Brain.* 2016;139(Pt 6):1700-12.
73. Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology.* 1976;26(11):1054-9.
74. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med.* 2001;7(3):365-8.
75. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 2011;69(2):418-22.
76. Compston DA, Vincent A, Newsom-Davis J, Batchelor JR. Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain.* 1980;103(3):579-601.

77. Vincent A, Palace J, Hilton-Jones D. Myasthenia gravis. *Lancet*. 2001;357(9274):2122-8.
78. Nix EH, van Leeuwen Y, Leite MI, Dekker FW, Wintzen AR, Wirtz PW, et al. Clinical fluctuations in MuSK myasthenia gravis are related to antigen-specific IgG4 instead of IgG1. *J Neuroimmunol*. 2008;195(1-2):151-6.
79. Takamori M, Takahashi M, Yasukawa Y, Iwasa K, Nemoto Y, Suenaga A, et al. Antibodies to recombinant synaptotagmin and calcium channel subtypes in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Sci*. 1995;133(1-2):95-101.
80. Sabater L, Titulaer M, Saiz A, Verschuuren J, Gure AO, Graus F. SOX1 antibodies are markers of paraneoplastic Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology*. 2008;70(12):924-8.
81. Lecky BR. Transient neonatal Lambert-Eaton syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(9):1094.
82. Posner JB, Furneaux HM. Paraneoplastic syndromes. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1990;68:187-219.
83. Posner JB, Dalmau J. Clinical enigmas of paraneoplastic neurologic disorders. *Clin Neurol Neurosurg*. 1995;97(1):61-70.
84. Hofberger R, Rosenfeld MR, Dalmau J. Update on neurological paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(6):489-95.
85. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(8):1135-40.
86. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med*. 2003;349(16):1543-54.
87. Vedeler CA, Antoine JC, Giometto B, Graus F, Grisold W, Hart IK, et al. Management of paraneoplastic neurological syndromes: report of an EFNS Task Force. *Eur J Neurol*. 2006;13(7):682-90.
88. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin Oncol*. 2006;33(3):270-98.
89. Dalmau J. NMDA receptor encephalitis and other antibody-mediated disorders of the synapse: The 2016 Cotzias Lecture. *Neurology*. 2016;87(23):2471-82.
90. Psimaras D, Carpentier AF, Rossi C, Euronetwork PNS. Cerebrospinal fluid study in paraneoplastic syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(1):42-5.
91. Lawn ND, Westmoreland BF, Kiely MJ, Lennon VA, Vernino S. Clinical, magnetic resonance imaging, and electroencephalographic findings in paraneoplastic limbic encephalitis. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(11):1363-8.
92. Titulaer MJ, Lang B, Verschuuren JJ. Lambert-Eaton myasthenic syndrome: from clinical characteristics to therapeutic strategies. *Lancet Neurol*. 2011;10(12):1098-107.
93. Graus F, Dalmau J. Paraneoplastic neurological syndromes. *Curr Opin Neurol*. 2012;25(6):795-801.
94. Giometto B, Grisold W, Vitaliani R, Graus F, Honnorat J, Bertolini G, et al. Paraneoplastic neurologic syndrome in the PNS Euronetwork database: a European study from 20 centers. *Arch Neurol*. 2010;67(3):330-5.
95. Benyahia B, Liblau R, Merle-Beral H, Tourani JM, Dalmau J, Delattre JY. Cell-mediated autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu antibodies. *Ann Neurol*. 1999;45(2):162-7.
96. Posner JB, Dalmau JO. Paraneoplastic syndromes of the nervous system. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(2):117-22.
97. Schreiber H, Rowley DA. Cancer. Quo vadis, specificity? *Science*. 2008;319(5860):164-5.

98. Melzer N, Meuth SG, Wiendl H. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *FASEB J*. 2009;23(11):3659-73.
99. Melzer N, Meuth SG, Wiendl H. Paraneoplastic and non-paraneoplastic autoimmunity to neurons in the central nervous system. *J Neurol*. 2013;260(5):1215-33.
100. Szabo A, Dalmau J, Manley G, Rosenfeld M, Wong E, Henson J, 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.
101. Jean WC, Dalmau J, Ho A, Posner JB. Analysis of the IgG subclass distribution and inflammatory infiltrates in patients with anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology*. 1994;44(1):140-7.
102. Dalmau J, Furneaux HM, Rosenblum MK, Graus F, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in specific regions of the nervous system and tumor from patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *Neurology*. 1991;41(11):1757-64.
103. De Giorgio R, Bovara M, Barbara G, Canossa M, Sarnelli G, De Ponti F, et al. Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility. *Gastroenterology*. 2003;125(1):70-9.
104. Greenlee JE, Clawson SA, Hill KE, Wood B, Clardy SL, Tsunoda I, et al. Neuronal uptake of anti-Hu antibody, but not anti-Ri antibody, leads to cell death in brain slice cultures. *J Neuroinflammation*. 2014;11:160.
105. Sillevs Smitt PA, Manley GT, Posner JB. Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. *Neurology*. 1995;45(10):1873-8.
106. Plonquet A, Gherardi RK, Creange A, Antoine JC, Benyahia B, Grisold W, et al. Oligoclonal T-cells in blood and target tissues of patients with anti-Hu syndrome. *J Neuroimmunol*. 2002;122(1-2):100-5.
107. Darnell RB, Albert ML. cdr2-specific CTLs are detected in the blood of all patients with paraneoplastic cerebellar degeneration analyzed. *Ann Neurol*. 2000;48(2):270-1.
108. Jaeckle KA, Graus F, Houghton A, Cardon-Cardo C, Nielsen SL, Posner JB. Autoimmune response of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration to a Purkinje cell cytoplasmic protein antigen. *Ann Neurol*. 1985;18(5):592-600.
109. Furneaux HM, Rosenblum MK, Dalmau J, Wong E, Woodruff P, Graus F, 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.
110. Hida C, Tsukamoto T, Awano H, Yamamoto T. Ultrastructural localization of anti-Purkinje cell antibody-binding sites in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Arch Neurol*. 1994;51(6):555-8.
111. Greenlee JE, Clawson SA, Hill KE, Wood BL, Tsunoda I, Carlson NG. Purkinje cell death after uptake of anti-Yo antibodies in cerebellar slice cultures. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(10):997-1007.
112. Tanaka K, Tanaka M, Onodera O, Igarashi S, Miyatake T, Tsuji S. Passive transfer and active immunization with the recombinant leucine-zipper (Yo) protein as an attempt to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neurol Sci*. 1994;127(2):153-8.
113. Graus F, Illa I, Agusti M, Ribalta T, Cruz-Sanchez F, Juarez C. Effect of intraventricular injection of an anti-Purkinje cell antibody (anti-Yo) in a guinea pig model. *J Neurol Sci*. 1991;106(1):82-7.

114. Greenlee JE, Burns JB, Rose JW, Jaeckle KA, Clawson S. Uptake of systemically administered human anticerebellar antibody by rat Purkinje cells following blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol.* 1995;89(4):341-5.
115. Storstein A, Krossnes BK, Vedeler CA. Morphological and immunohistochemical characterization of paraneoplastic cerebellar degeneration associated with Yo antibodies. *Acta Neurol Scand.* 2009;120(1):64-7.
116. Christgau S, Aanstoot HJ, Schierbeck H, Begley K, Tullin S, Hejnaes K, et al. Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH2-terminal domain. *J Cell Biol.* 1992;118(2):309-20.
117. Wu Y, Matsui H, Tomizawa K. Amphiphysin I and regulation of synaptic vesicle endocytosis. *Acta Med Okayama.* 2009;63(6):305-23.
118. Geis C, Weishaupt A, Hallermann S, Grunewald B, Wessig C, Wultsch T, et al. Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain.* 2010;133(11):3166-80.
119. Hansen N, Grunewald B, Weishaupt A, Colaco MN, Toyka KV, Sommer C, et al. Human Stiff person syndrome IgG-containing high-titer anti-GAD65 autoantibodies induce motor dysfunction in rats. *Exp Neurol.* 2013;239:202-9.
120. Hernandez-Echebarria L, Saiz A, Ares A, Tejada J, Garcia-Tunon L, Nieves C, et al. Paraneoplastic encephalomyelitis associated with pancreatic tumor and anti-GAD antibodies. *Neurology.* 2006;66(3):450-1.
121. Bataller L, Valero C, Diaz R, Froufe A, Garcia-Zarza A, Ribalta T, et al. Cerebellar ataxia associated with neuroendocrine thymic carcinoma and GAD antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(6):696-7.
122. Arino H, Hoftberger R, Gresa-Arribas N, Martinez-Hernandez E, Armangue T, Kruer MC, et al. Paraneoplastic Neurological Syndromes and Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies. *JAMA Neurol.* 2015;72(8):874-81.
123. Sommer C, Weishaupt A, Brinkhoff J, Biko L, Wessig C, Gold R, et al. Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet.* 2005;365(9468):1406-11.
124. Geis C, Grunewald B, Weishaupt A, Wultsch T, Toyka KV, Reif A, et al. Human IgG directed against amphiphysin induces anxiety behavior in a rat model after intrathecal passive transfer. *J Neural Transm (Vienna).* 2012;119(8):981-5.
125. Pittock SJ, Lucchinetti CF, Parisi JE, Benarroch EE, Mokri B, Stephan CL, et al. Amphiphysin autoimmunity: paraneoplastic accompaniments. *Ann Neurol.* 2005;58(1):96-107.
126. Vincent A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):797-804.
127. Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science.* 1973;180(4088):871-2.
128. Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs. *J Exp Med.* 1975;141(6):1365-75.
129. Tarrab-Hazdai R, Aharonov A, Silman I, Fuchs S, Abramsky O. Experimental autoimmune myasthenia induced in monkeys by purified acetylcholine receptor. *Nature.* 1975;256(5513):128-30.
130. Toyka KV, Brachman DB, Pestronk A, Kao I. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science.* 1975;190(4212):397-9.
131. Engel AG, Lambert EH, Howard FM. Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic

- correlations. *Mayo Clin Proc.* 1977;52(5):267-80.
132. Sahashi K, Engel AG, Lambert EH, Howard FM, Jr. Ultrastructural localization of the terminal and lytic ninth complement component (C9) at the motor end-plate in myasthenia gravis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1980;39(2):160-72.
133. Lennon VA, Lambert EH. Myasthenia gravis induced by monoclonal antibodies to acetylcholine receptors. *Nature.* 1980;505:106-20.
134. Tzartos SJ, Barkas T, Cung MT, Mamalaki A, Marraud M, Orlewski P, et al. Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. *Immunol Rev.* 1998;163:89-120.
135. Vrolix K, Fraussen J, Molenaar PC, Losen M, Somers V, Stinissen P, et al. The auto-antigen repertoire in myasthenia gravis. *Autoimmunity.* 2010;43(5-6):380-400.
136. Sun C, Zhang H, Xu J, Gao J, Qi X, Li Z. Improved methodology to obtain large quantities of correctly folded recombinant N-terminal extracellular domain of the human muscle acetylcholine receptor for inducing experimental autoimmune myasthenia gravis in rats. *Arch Med Sci.* 2014;10(2):389-95.
137. Drachman DB, Angus CW, Adams RN, Michelson JD, Hoffman GJ. Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N Engl J Med.* 1978;298(20):1116-22.
138. Vernet-der Garabedian B, Morel E, Bach JF. Heterogeneity of antibodies directed against the alpha-bungarotoxin binding site on human acetylcholine receptor and severity of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 1986;12(1):65-74.
139. Wintzen AR, Plomp JJ, Molenaar PC, van Dijk JG, van Kempen GT, Vos RM, et al. Acquired slow-channel syndrome: a form of myasthenia gravis with prolonged open time of the acetylcholine receptor channel. *Ann Neurol.* 1998;44(4):657-64.
140. Bufler J, Pitz R, Czep M, Wick M, Franke C. Purified IgG from seropositive and seronegative patients with myasthenia gravis reversibly blocks currents through nicotinic acetylcholine receptor channels. *Ann Neurol.* 1998;43(4):458-64.
141. Hohlfeld R, Toyka KV, Heininger K, Grosse-Wilde H, Kalies I. Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor. *Nature.* 1984;310(5974):244-6.
142. Link H, Olsson O, Sun J, Wang WZ, Andersson G, Ekre HP, et al. Acetylcholine receptor-reactive T and B cells in myasthenia gravis and controls. *J Clin Invest.* 1991;87(6):2191-6.
143. Hawke S, Matsuo H, Nicolle M, Malcherek G, Melms A, Willcox N. Autoimmune T cells in myasthenia gravis: heterogeneity and potential for specific immunotargeting. *Immunol Today.* 1996;17(7):307-11.
144. Granerod J, Ambrose HE, Davies NW, Clewley JP, Walsh AL, Morgan D, et al. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(12):835-44.
145. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2008;7(12):1091-8.
146. Dalmau J, Tuzun E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, et al. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol.* 2007;61(1):25-36.
147. Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, Seeholzer SH, Lynch DR. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the

- GluN1 amino terminal domain. *J Neurosci.* 2012;32(32):11082-94.
148. Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangue T, Glaser C, Iizuka T, et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):157-65.
149. Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2014;13(2):167-77.
150. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry.* 1994;51(3):199-214.
151. Gunduz-Bruce H. The acute effects of NMDA antagonism: from the rodent to the human brain. *Brain Res Rev.* 2009;60(2):279-86.
152. Ohba C, Shiina M, Tohyama J, Haginoya K, Lerman-Sagie T, Okamoto N, et al. GRIN1 mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped movement disorders. *Epilepsia.* 2015;56(6):841-8.
153. Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, et al. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci.* 2010;30(17):5866-75.
154. Tuzun E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol.* 2009;118(6):737-43.
155. Planaguma J, Leypoldt F, Mannara F, Gutierrez-Cuesta J, Martin-Garcia E, Aguilar E, et al. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain.* 2015;138(Pt 1):94-109.
156. Lancaster E, Dalmau J. Neuronal autoantigens--pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(7):380-90.
157. Kinsbourne M. Myoclonic encephalopathy of infants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1962;25(3):271-6.
158. Bellur SN. Opsoclonus: Its clinical value. *Neurology.* 1975;25(6):502-7.
159. Fahn S, Marsden CD, Van Woert MH. Definition and classification of myoclonus. *Adv Neurol.* 1986;43:1-5.
160. Pranzatelli MR. The neurobiology of the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Clin Neuropharmacol.* 1992;15(3):186-228.
161. Cogan DG. *Handbook of clinical Neurology*; 1978.
162. Sahu JK, Prasad K. The opsoclonus-myoclonus syndrome. *Pract Neurol.* 2011;11(3):160-6.
163. Armangue T, Titulaer MJ, Sabater L, Pardo-Moreno J, Gresa-Arribas N, Barbero-Bordallo N, et al. A novel treatment-responsive encephalitis with frequent opsoclonus and teratoma. *Ann Neurol.* 2014;75(3):435-41.
164. Anderson NE, Budde-Steffen C, Rosenblum MK, Graus F, Ford D, Synek BJ, et al. Opsoclonus, myoclonus, ataxia, and encephalopathy in adults with cancer: a distinct paraneoplastic syndrome. *Medicine (Baltimore).* 1988;67(2):100-9.
165. Digre KB. Opsoclonus in adults. Report of three cases and review of the literature. *Arch Neurol.* 1986;43(11):1165-75.
166. Armangue T, Petit-Pedrol M, Dalmau J. Autoimmune encephalitis in children. *J Child Neurol.* 2012;27(11):1460-9.
167. Panzer J, Dalmau J. Movement disorders in paraneoplastic and autoimmune disease. *Curr Opin Neurol.* 2011;24(4):346-53.

168. Singhi P, Sahu JK, Sarkar J, Bansal D. Clinical profile and outcome of children with opsoclonus-myoclonus syndrome. *J Child Neurol.* 2014;29(1):58-61.
169. Ziter FA, Bray PF, Cancilla PA. Neuropathologic findings in a patient with neuroblastoma and myoclonic encephalopathy. *Arch Neurol.* 1979;36(1):51.
170. Moe PG, Nellhaus G. Infantile polymyoclonia-opsoclonus syndrome and neural crest tumors. *Neurology.* 1970;20(8):756-64.
171. Boltshauser E, Deonna T, Hirt HR. Myoclonic encephalopathy of infants or "dancing eyes syndrome". Report of 7 cases with long-term follow-up and review of the literature (cases with and without neuroblastoma). *Helv Paediatr Acta.* 1979;34(2):119-33.
172. Tate ED, Allison TJ, Pranzatelli MR, Verhulst SJ. Neuroepidemiologic trends in 105 US cases of pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2005;22(1):8-19.
173. Brunklaus A, Pohl K, Zuberi SM, de Sousa C. Outcome and prognostic features in opsoclonus-myoclonus syndrome from infancy to adult life. *Pediatrics.* 2011;128(2):e388-94.
174. Vincent FM. Paraneoplastic CNS and renal syndromes. Simultaneous occurrence in a patient with bronchogenic carcinoma. *JAMA.* 1978;240(9):862-3.
175. Lechi A, Tedeschi F, Terzano MG, Trabattoni G. Opsoclonus and myoclonus in malignant disease. A case report. *Acta Neurol (Napoli).* 1983;5(3):205-9.
176. Caviness JN, Forsyth PA, Layton DD, McPhee TJ. The movement disorder of adult opsoclonus. *Mov Disord.* 1995;10(1):22-7.
177. Klaas JP, Ahlskog JE, Pittock SJ, Matsumoto JY, Aksamit AJ, Bartleson JD, et al. Adult-onset opsoclonus-myoclonus syndrome. *Arch Neurol.* 2012;69(12):1598-607.
178. Bataller L, Graus F, Saiz A, Vilchez JJ, Spanish Opsoclonus-Myoclonus Study G. Clinical outcome in adult onset idiopathic or paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *Brain.* 2001;124(Pt 2):437-43.
179. Armangue T, Sabater L, Torres-Vega E, Martinez-Hernandez E, Arino H, Petit-Pedrol M, et al. Clinical and Immunological Features of Opsoclonus-Myoclonus Syndrome in the Era of Neuronal Cell Surface Antibodies. *JAMA Neurol.* 2016;73(4):417-24.
180. Graus F, Cordon-Cardo C, Cho ES, Posner JB. Opsoclonus and oat cell carcinoma of lung: lack of evidence for anti-CNS antibodies. *Lancet.* 1984;1(8392):1479.
181. Ross AT, Zeman W. Opsoclonus, occult carcinoma, and chemical pathology in dentate nuclei. *Arch Neurol.* 1967;17(5):546-51.
182. Cogan DG. Ocular dysmetria; flutterlike oscillations of the eyes, and opsoclonus. *AMA Arch Ophthalmol.* 1954;51(3):318-35.
183. Ellenberger C, Jr., Campa JF, Netsky MG. Opsoclonus and parenchymatous degeneration of the cerebellum. The cerebellar origin of an abnormal ocular movement. *Neurology.* 1968;18(11):1041-6.
184. Ellenberger C, Jr., Keltner JL, Stroud MH. Ocular dyskinesia in cerebellar disease. Evidence for the similarity of opsoclonus, ocular dysmetria and flutter-like oscillations. *Brain.* 1972;95(4):685-92.
185. Hormigo A, Dalmau J, Rosenblum MK, River ME, Posner JB. Immunological and pathological study of anti-Ri-associated encephalopathy. *Ann Neurol.* 1994;36(6):896-902.
186. Ridley A, Kennard C, Scholtz CL, Buttner-Ennever JA, Summers B, Turnbull A. Omnipause neurons in two cases of opsoclonus associated with oat cell carcinoma of the lung. *Brain.* 1987;110 ( Pt 6):1699-709.

187. Kaneko CR. Effect of ibotenic acid lesions of the omnipause neurons on saccadic eye movements in rhesus macaques. *J Neurophysiol.* 1996;75(6):2229-42.
188. Wong AM, Musallam S, Tomlinson RD, Shannon P, Sharpe JA. Opsoclonus in three dimensions: oculographic, neuropathologic and modelling correlates. *J Neurol Sci.* 2001;189(1-2):71-81.
189. Henson RA, Urich H. Cancer and the nervous system: the neurological manifestations of systemic malignant disease. London: Blackwell; 1982.
190. Dale RC. Childhood opsoclonus myoclonus. *Lancet Neurol.* 2003;2(5):270.
191. Korfei M, Fuhlhuber V, Schmidt-Woll T, Kaps M, Preissner KT, Blaes F. Functional characterisation of autoantibodies from patients with pediatric opsoclonus-myoclonus-syndrome. *J Neuroimmunol.* 2005;170(1-2):150-7.
192. Antunes NL, Khakoo Y, Matthay KK, Seeger RC, Stram DO, Gerstner E, et al. Antineuronal antibodies in patients with neuroblastoma and paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000;22(4):315-20.
193. Blaes F, Fuhlhuber V, Korfei M, Tschernatsch M, Behnisch W, Rostasy K, et al. Surface-binding autoantibodies to cerebellar neurons in opsoclonus syndrome. *Ann Neurol.* 2005;58(2):313-7.
194. Kirsten A, Beck S, Fuhlhuber V, Kaps M, Kreutz T, Korfei M, et al. New autoantibodies in pediatric opsoclonus myoclonus syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1110:256-60.
195. Blaes F, Jauss M, Kraus J, Oschmann P, Krasenbrink I, Kaps M, et al. Adult paraneoplastic opsoclonus-myoclonus syndrome associated with antimitochondrial autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(11):1595-6.
196. Deconinck N, Scaillon M, Segers V, Groswasser JJ, Dan B. Opsoclonus-myoclonus associated with celiac disease. *Pediatr Neurol.* 2006;34(4):312-4.
197. Fisher PG, Wechsler DS, Singer HS. Anti-Hu antibody in a neuroblastoma-associated paraneoplastic syndrome. *Pediatr Neurol.* 1994;10(4):309-12.
198. Lamotte G, Danaila TC, Jaillon-Riviere V, Hitier M, Defer GL. Paraneoplastic opsoclonus myoclonus with autoantibodies to glutamic acid decarboxylase. *Rev Neurol (Paris).* 2014;170(1):50-1.
199. Bhandari HS. Presentation of opsoclonus myoclonus ataxia syndrome with glutamic acid decarboxylase antibodies. *BMJ Case Rep.* 2012;2012.
200. Bataller L, Rosenfeld MR, Graus F, Vilchez JJ, Cheung NK, Dalmau J. Autoantigen diversity in the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Ann Neurol.* 2003;53(3):347-53.
201. Noetzel MJ, Cawley LP, James VL, Minard BJ, Agrawal HC. Anti-neurofilament protein antibodies in opsoclonus-myoclonus. *J Neuroimmunol.* 1987;15(2):137-45.
202. Candler PM, Dale RC, Griffin S, Church AJ, Wait R, Chapman MD, et al. Post-streptococcal opsoclonus-myoclonus syndrome associated with anti-neuroleukin antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77(4):507-12.
203. Weizman DA, Leong WL. Anti-Ri antibody opsoclonus-myoclonus syndrome and breast cancer: a case report and a review of the literature. *J Surg Oncol.* 2004;87(3):143-5.
204. Wirtz PW, Sillevius Smitt PA, Hoff JI, de Leeuw B, Lammers GJ, van Duinen SG, et al. Anti-Ri antibody positive opsoclonus-myoclonus in a male patient with breast carcinoma. *J Neurol.* 2002;249(12):1710-2.
205. Morales-Briceno H, Rodriguez-Violante M, Cervantes-Arriaga A, Irani SR, Lees AJ, Silveira-Moriyama L.

- Opsoclonus myoclonus syndrome associated with GQ1b antibodies. *Mov Disord.* 2012;27(13):1615-6.
206. Petit-Pedrol M, Armangue T, Peng X, Bataller L, Cellucci T, Davis R, et al. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2014;13(3):276-86.
207. DeFelipe-Mimbrera A, Masjuan J, Corral I, Villar LM, Graus F, Garcia-Barragan N. Opsoclonus-myoclonus syndrome and limbic encephalitis associated with GABAB receptor antibodies in CSF. *J Neuroimmunol.* 2014;272(1-2):91-3.
208. Smith JH, Dhamija R, Moseley BD, Sandroni P, Lucchinetti CF, Lennon VA, et al. N-methyl-D-aspartate receptor autoimmune encephalitis presenting with opsoclonus-myoclonus: treatment response to plasmapheresis. *Arch Neurol.* 2011;68(8):1069-72.
209. Kurian M, Lalive PH, Dalmau JO, Horvath J. Opsoclonus-myoclonus syndrome in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Arch Neurol.* 2010;67(1):118-21.
210. Player B, Harmelink M, Bordini B, Weisgerber M, Girolami M, Croix M. Pediatric Opsoclonus-Myoclonus-Ataxia Syndrome Associated With Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis. *Pediatr Neurol.* 2015;53(5):456-8.
211. Kambe T, Takahashi Y, Furukawa Y. A mild form of adult-onset opsoclonus-myoclonus syndrome associated with antiglutamate receptor antibodies. *JAMA Neurol.* 2013;70(5):654-5.
212. Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA. Anti-neuronal nuclear autoantibody type 2: paraneoplastic accompaniments. *Ann Neurol.* 2003;53(5):580-7.
213. Calic Z, Mellick R. Adult onset opsoclonus-myoclonus syndrome associated with positive voltage-gated potassium channel-complex antibodies. 1st European Journal of Neurology Congress 2015.
214. Pranzatelli MR, Tate ED, Wheeler A, Bass N, Gold AP, Griebel ML, et al. Screening for autoantibodies in children with opsoclonus-myoclonus-ataxia. *Pediatr Neurol.* 2002;27(5):384-7.
215. Antunes NL, De Angelis LM. Neurologic consultations in children with systemic cancer. *Pediatr Neurol.* 1999;20(2):121-4.
216. Fuhlhuber V, Bick S, Tschernatsch M, Dharmalingam B, Kaps M, Preissner KT, et al. Autoantibody-mediated cytotoxicity in paediatric opsoclonus-myoclonus syndrome is dependent on ERK-1/2 phosphorylation. *J Neuroimmunol.* 2015;289:182-6.
217. Sabater L, Xifro X, Saiz A, Alberch J, Graus F. Analysis of antibodies to neuronal surface antigens in adult opsoclonus-myoclonus. *J Neuroimmunol.* 2008;196(1-2):188-91.
218. Pranzatelli MR, Travelstead AL, Tate ED, Allison TJ, Moticka EJ, Franz DN, et al. B- and T-cell markers in opsoclonus-myoclonus syndrome: immunophenotyping of CSF lymphocytes. *Neurology.* 2004;62(9):1526-32.
219. Pranzatelli MR, Tate ED, McGee NR, Colliver JA. Cytokines, cytokine antagonists, and soluble adhesion molecules in pediatric OMS and other neuroinflammatory disorders. *J Neurol Sci.* 2013;326(1-2):53-8.
220. Pranzatelli MR, Tate ED, Hoefgen ER, Swan JA, Colliver JA. Therapeutic down-regulation of central and peripheral B-cell-activating factor (BAFF) production in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *Cytokine.* 2008;44(1):26-32.
221. Pranzatelli MR, Tate ED, McGee NR, Travelstead AL, Ransohoff RM, Ness JM, et al. Key role of CXCL13/CXCR5 axis for cerebrospinal fluid B cell recruitment in pediatric

- OMS. *J Neuroimmunol.* 2012;243(1-2):81-8.
222. Newsom-Davis J, Mills KR. Immunological associations of acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). Report of five cases and literature review. *Brain.* 1993;116 ( Pt 2):453-69.
223. Rana SS, Ramanathan RS, Small G, Adamovich B. Paraneoplastic Isaacs' syndrome: a case series and review of the literature. *J Clin Neuromuscul Dis.* 2012;13(4):228-33.
224. Isaacs H. A Syndrome of Continuous Muscle-Fibre Activity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1961;24(4):319-25.
225. Hart IK, Maddison P, Newsom-Davis J, Vincent A, Mills KR. Phenotypic variants of autoimmune peripheral nerve hyperexcitability. *Brain.* 2002;125(Pt 8):1887-95.
226. American Association of Electrodiagnostic Medicine glossary of terms in electrodiagnostic medicine. *Muscle Nerve Suppl.* 2001;10:S1-50.
227. Rubio-Agusti I, Perez-Miralles F, Sevilla T, Muelas N, Chumillas MJ, Mayordomo F, et al. Peripheral nerve hyperexcitability: a clinical and immunologic study of 38 patients. *Neurology.* 2011;76(2):172-8.
228. Deymeer F, Oge AE, Serdaroglu P, Yazici J, Ozdemir C, Baslo A. The use of botulinum toxin in localizing neuromyotonia to the terminal branches of the peripheral nerve. *Muscle Nerve.* 1998;21(5):643-6.
229. Maddison P. Neuromyotonia. *Clin Neurophysiol.* 2006;117(10):2118-27.
230. Falace A, Striano P, Manganeli F, Coppola A, Striano S, Minetti C, et al. Inherited neuromyotonia: a clinical and genetic study of a family. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(1):23-7.
231. Hart IK, Waters C, Vincent A, Newland C, Beeson D, Pongs O, et al. Autoantibodies detected to expressed K<sup>+</sup> channels are implicated in neuromyotonia. *Ann Neurol.* 1997;41(2):238-46.
232. Auger RG. AAEM minimonograph #44: diseases associated with excess motor unit activity. *Muscle Nerve.* 1994;17(11):1250-63.
233. Serratrice G, Azulay JP. [What is left of Morvan's fibrillary chorea?]. *Rev Neurol (Paris).* 1994;150(4):257-65.
234. Barber PA, Anderson NE, Vincent A. Morvan's syndrome associated with voltage-gated K<sup>+</sup> channel antibodies. *Neurology.* 2000;54(3):771-2.
235. Liguori R, Vincent A, Clover L, Avoni P, Plazzi G, Cortelli P, et al. Morvan's syndrome: peripheral and central nervous system and cardiac involvement with antibodies to voltage-gated potassium channels. *Brain.* 2001;124(Pt 12):2417-26.
236. Ahmed A, Simmons Z. Isaacs syndrome: A review. *Muscle Nerve.* 2015;52(1):5-12.
237. Gallin WJ, Boutet PA. VKCDB: voltage-gated K<sup>+</sup> channel database updated and upgraded. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D362-6.
238. Vincent A, Roberts M, Willison H, Lang B, Newsom-Davis J. Autoantibodies, neurotoxins and the nervous system. *J Physiol Paris.* 1995;89(3):129-36.
239. Sonoda Y, Arimura K, Kurono A, Suehara M, Kameyama M, Minato S, et al. Serum of Isaacs' syndrome suppresses potassium channels in PC-12 cell lines. *Muscle Nerve.* 1996;19(11):1439-46.
240. Newsom-Davis J. Autoimmune neuromyotonia (Isaacs' syndrome): an antibody-mediated potassium channelopathy. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;835:111-9.
241. Shillito P, Molenaar PC, Vincent A, Leys K, Zheng W, van den Berg RJ, et al. Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K<sup>+</sup> channels of peripheral nerves. *Ann Neurol.* 1995;38(5):714-22.
242. Nagado T, Arimura K, Sonoda Y, Kurono A, Horikiri Y, Kameyama A, et al. Potassium current suppression in patients with peripheral nerve

- hyperexcitability. *Brain*. 1999;122 ( Pt 11):2057-66.
243. Vernino S, Lennon VA. Ion channel and striational antibodies define a continuum of autoimmune neuromuscular hyperexcitability. *Muscle Nerve*. 2002;26(5):702-7.
244. Buckley C, Oger J, Clover L, Tuzun E, Carpenter K, Jackson M, et al. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):73-8.
245. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol*. 2010;9(8):776-85.
246. Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, 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.
247. Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, et al. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol*. 2011;69(2):303-11.
248. Irani SR, Pettingill P, Kleopa KA, Schiza N, Waters P, Mazia C, et al. Morvan syndrome: clinical and serological observations in 29 cases. *Ann Neurol*. 2012;72(2):241-55.
249. van Sonderen A, Schreurs MW, de Bruijn MA, Boukhrissi S, Nagtzaam MM, Hulsenboom ES, et al. The relevance of VGKC positivity in the absence of LGI1 and Caspr2 antibodies. *Neurology*. 2016;86(18):1692-9.
250. Joubert B, Saint-Marin M, Noraz N, Picard G, Rogemond V, Ducray F, et al. Characterization of a subtype of autoimmune encephalitis with anti-Contactin-Associated Protein-like 2 antibodies in the cerebrospinal fluid, prominent limbic symptoms, and seizures. *JAMA Neurol*. 2016;73(9):1115-24.
251. Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Saenz A, Poza JJ, Galan J, et al. Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet*. 2002;11(9):1119-28.
252. Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, et al. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med*. 2006;354(13):1370-7.
253. Paterson RW, Zandi MS, Armstrong R, Vincent A, Schott JM. Clinical relevance of positive voltage-gated potassium channel (VGKC)-complex antibodies: experience from a tertiary referral centre. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85(6):625-30.
254. Klein CJ, Lennon VA, Aston PA, McKeon A, Pittock SJ. Chronic pain as a manifestation of potassium channel-complex autoimmunity. *Neurology*. 2012;79(11):1136-44.
255. Huda S, Wong SH, Pettingill P, O'Connell D, Vincent A, Steiger M. An 11-year retrospective experience of antibodies against the voltage-gated potassium channel (VGKC) complex from a tertiary neurological centre. *J Neurol*. 2015;262(2):418-24.
256. Klein CJ, Lennon VA, Aston PA, McKeon A, O'Toole O, Quek A, et al. Insights from LGI1 and CASPR2 potassium channel complex autoantibody subtyping. *JAMA Neurol*. 2013;70(2):229-34.
257. Gordon MT, St John J, Braidman IP, Anderson DC. Bone conditioned medium enhances cell aggregation, cell proliferation and alkaline phosphatase activity in serum-deprived medium. *Bone*. 1990;11(2):121-6.

258. Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, et al. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain*. 2004;127(Pt 3):701-12.
259. Lilleker JB, Jones MS, Mohanraj R. VGKC complex antibodies in epilepsy: diagnostic yield and therapeutic implications. *Seizure*. 2013;22(9):776-9.
260. Fujita K, Yuasa T, Watanabe O, Takahashi Y, Hashiguchi S, Adachi K, et al. Voltage-gated potassium channel complex antibodies in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol*. 2012;259(10):2249-50.
261. Reeback J, Benton S, Swash M, Schwartz MS. Penicillamine-induced neuromyotonia. *Br Med J*. 1979;1(6176):1464-5.
262. Mygland A, Vincent A, Newsom-Davis J, Kaminski H, Zorzato F, Agius M, et al. Autoantibodies in thymoma-associated myasthenia gravis with myositis or neuromyotonia. *Arch Neurol*. 2000;57(4):527-31.
263. Ohkawa T, Fukata Y, Yamasaki M, Miyazaki T, Yokoi N, Takashima H, et al. Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. *J Neurosci*. 2013;33(46):18161-74.
264. Sinha S, Newsom-Davis J, Mills K, Byrne N, Lang B, Vincent A. Autoimmune aetiology for acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). *Lancet*. 1991;338(8759):75-7.
265. Partanen VS, Soininen H, Saksa M, Riekkinen P. Electromyographic and nerve conduction findings in a patient with neuromyotonia, normocalcemic tetany and small-cell lung cancer. *Acta Neurol Scand*. 1980;61(4):216-26.
266. Fleisher J, Richie M, Price R, Scherer S, Dalmau J, Lancaster E. Acquired neuromyotonia heralding recurrent thymoma in myasthenia gravis. *JAMA Neurol*. 2013;70(10):1311-4.
267. Issa SS, Herskovitz S, Lipton RB. Acquired neuromyotonia as a paraneoplastic manifestation of ovarian cancer. *Neurology*. 2011;76(1):100-1.
268. Engels EA, Pfeiffer RM. Malignant thymoma in the United States: demographic patterns in incidence and associations with subsequent malignancies. *Int J Cancer*. 2003;105(4):546-51.
269. Souadjian JV, Enriquez P, Silverstein MN, Pepin JM. The spectrum of diseases associated with thymoma. Coincidence or syndrome? *Arch Intern Med*. 1974;134(2):374-9.
270. Mao ZF, Mo XA, Qin C, Lai YR, Hackett ML. Incidence of thymoma in myasthenia gravis: a systematic review. *J Clin Neurol*. 2012;8(3):161-9.
271. Zekeridou A, McKeon A, Lennon VA. Frequency of Synaptic Autoantibody Accompaniments and Neurological Manifestations of Thymoma. *JAMA Neurol*. 2016;73(7):853-9.
272. Marx A, Willcox N, Leite MI, Chuang WY, Schalke B, Nix W, et al. Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis. *Autoimmunity*. 2010;43(5-6):413-27.
273. Shelly S, Agmon-Levin N, Altman A, Shoenfeld Y. Thymoma and autoimmunity. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(3):199-202.
274. Kim HK, Choi YS, Kim J, Shim YM, Han J, Kim K. Type B thymoma: is prognosis predicted only by World Health Organization classification? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(6):1431-5 e1.
275. Roden AC, Yi ES, Jenkins SM, Edwards KK, Donovan JL, Cassivi SD, et al. Modified Masaoka stage and size are independent prognostic predictors in thymoma and modified Masaoka stage is superior to histopathologic classifications. *J Thorac Oncol*. 2015;10(4):691-700.
276. Vernino S, Lennon VA. Autoantibody profiles and neurological

- correlations of thymoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(21):7270-5.
277. Vernino S, Eggenberger ER, Rogers LR, Lennon VA. Paraneoplastic neurological autoimmunity associated with ANNA-1 autoantibody and thymoma. *Neurology.* 2002;59(6):929-32.
278. Willcox N. Myasthenia gravis. *Curr Opin Immunol.* 1993;5(6):910-7.
279. Shoenfeld Y, Lorber M, Yucel T, Yazici H. Primary antiphospholipid syndrome emerging following thymectomy for myasthenia gravis: additional evidence for the kaleidoscope of autoimmunity. *Lupus.* 1997;6(5):474-6.
280. Schonbeck S, Padberg F, Hohlfeld R, Wekerle H. Transplantation of thymic autoimmune microenvironment to severe combined immunodeficiency mice. A new model of myasthenia gravis. *J Clin Invest.* 1992;90(1):245-50.
281. Tokunaga T, Hayashi A, Kadota Y, Shiono H, Inoue M, Sawabata N, et al. Regulation of Th-POK and Runx3 in T cell development in human thymoma. *Autoimmunity.* 2009;42(8):653-60.
282. Kyewski BA. Thymic dendritic cells present blood-borne antigens to medullary thymocytes in vivo: a possible role in the generation of the T-cell repertoire. *Haematol Blood Transfus.* 1985;29:486-91.
283. Buckley C, Douek D, Newsom-Davis J, Vincent A, Willcox N. Mature, long-lived CD4+ and CD8+ T cells are generated by the thymoma in myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):64-72.
284. Hoffacker V, Schultz A, Tiesinga JJ, Gold R, Schalke B, Nix W, et al. Thymomas alter the T-cell subset composition in the blood: a potential mechanism for thymoma-associated autoimmune disease. *Blood.* 2000;96(12):3872-9.
285. Okumura M, Fujii Y, Shiono H, Inoue M, Minami M, Utsumi T, et al. Immunological function of thymoma and pathogenesis of paraneoplastic myasthenia gravis. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;56(4):143-50.
286. Theofilopoulos AN, Dummer W, Kono DH. T cell homeostasis and systemic autoimmunity. *J Clin Invest.* 2001;108(3):335-40.
287. Savino W, Mangarella G, Verley JM, Wolff A, Berrih S, Levasseur P, et al. Thymoma epithelial cells secrete thymic hormone but do not express class II antigens of the major histocompatibility complex. *J Clin Invest.* 1985;76(3):1140-6.
288. Strobel P, Helmreich M, Kalbacher H, Muller-Hermelink HK, Marx A. Evidence for distinct mechanisms in the shaping of the CD4 T cell repertoire in histologically distinct myasthenia gravis-associated thymomas. *Dev Immunol.* 2001;8(3-4):279-90.
289. Fletcher AL, Seach N, Reiseger JJ, Lowen TE, Hammett MV, Scott HS, et al. Reduced thymic Aire expression and abnormal NF-kappa B2 signaling in a model of systemic autoimmunity. *J Immunol.* 2009;182(5):2690-9.
290. Liu Y, Zhang H, Zhang P, Meng F, Chen Y, Wang Y, et al. Autoimmune regulator expression in thymomas with or without autoimmune disease. *Immunol Lett.* 2014;161(1):50-6.
291. Kisand K, Lilic D, Casanova JL, Peterson P, Meager A, Willcox N. Mucocutaneous candidiasis and autoimmunity against cytokines in APECED and thymoma patients: clinical and pathogenetic implications. *Eur J Immunol.* 2011;41(6):1517-27.
292. Marx A, Muller-Hermelink HK, Strobel P. The role of thymomas in the development of myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;998:223-36.
293. Buckley C, Newsom-Davis J, Willcox N, Vincent A. Do titin and cytokine antibodies in MG patients predict thymoma or thymoma recurrence? *Neurology.* 2001;57(9):1579-82.
294. Sabater L, Gaig C, Gelpi E, Bataller L, Lewerenz J, Torres-Vega E, et

- al. A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: a case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study. *Lancet Neurol.* 2014;13(6):575-86.
295. Torres-Vega E, Duran-Moreno M, Sanchez Del Pino M, Yanez Y, Canete A, Castel V, et al. Immunoproteomic studies on paediatric opsoclonus-myoclonus associated with neuroblastoma. *J Neuroimmunol.* 2016;297:98-102.
296. Laurencin C, Andre-Obadia N, Camdessanche JP, Mauguere F, Ong E, Vukusic S, et al. Peripheral small fiber dysfunction and neuropathic pain in patients with Morvan syndrome. *Neurology.* 2015;85(23):2076-8.
297. Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat Protoc.* 2008;3(11):1718-28.
298. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14440-5.
299. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(1):144-56.
300. Nishi T, Yokoyama S, Takamori S, Matsuo T, Murakami D, Akagi Y, et al. Thymoma in Patient with Myasthenia Gravis Has Significantly Fewer Forkhead Box P3 Positive Lymphocytes than that without One. *Kurume Med J.* 2015;61(3-4):65-71.
301. Leite MI, Strobel P, Jones M, Micklem K, Moritz R, Gold R, et al. Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG. *Ann Neurol.* 2005;57(3):444-8.
302. Masaoka A. Staging system of thymoma. *J Thorac Oncol.* 2010;5(10 Suppl 4):S304-12.
303. Hurlock EC, McMahon A, Joho RH. Purkinje-cell-restricted restoration of Kv3.3 function restores complex spikes and rescues motor coordination in *Kcnc3* mutants. *J Neurosci.* 2008;28(18):4640-8.
304. Matsukawa H, Wolf AM, Matsushita S, Joho RH, Knopfel T. Motor dysfunction and altered synaptic transmission at the parallel fiber-Purkinje cell synapse in mice lacking potassium channels Kv3.1 and Kv3.3. *J Neurosci.* 2003;23(20):7677-84.
305. Waters MF, Minassian NA, Stevanin G, Figueroa KP, Bannister JP, Nolte D, et al. Mutations in voltage-gated potassium channel *KCNC3* cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet.* 2006;38(4):447-51.
306. Walther M, Kuklinski S, Pesheva P, Guntinas-Lichius O, Angelov DN, Neiss WF, et al. Galectin-3 is upregulated in microglial cells in response to ischemic brain lesions, but not to facial nerve axotomy. *J Neurosci Res.* 2000;61(4):430-5.
307. Pang J, Rhodes DH, Pini M, Akasheh RT, Castellanos KJ, Cabay RJ, et al. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. *PLoS One.* 2013;8(2):e57915.
308. Dyomin VG, Chaganti SR, Dyomina K, Palanisamy N, Murty VV, Dalla-Favera R, et al. *BCL8* is a novel, evolutionarily conserved human gene family encoding proteins with presumptive protein kinase A anchoring function. *Genomics.* 2002;80(2):158-65.
309. Medrihan L, Rohlmann A, Fairless R, Andrae J, Doring M, Missler M, et al. Neurobeachin, a protein implicated in membrane protein traffic and autism, is required for the formation and functioning of central synapses. *J Physiol.* 2009;587(Pt 21):5095-106.

310. Rudy B, McBain CJ. Kv3 channels: voltage-gated K<sup>+</sup> channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci.* 2001;24(9):517-26.
311. Brooke RE, Pyner S, McLeish P, Buchan S, Deuchars J, Deuchars SA. Spinal cord interneurons labelled transneuronally from the adrenal gland by a GFP-herpes virus construct contain the potassium channel subunit Kv3.1b. *Auton Neurosci.* 2002;98(1-2):45-50.
312. Ho CS, Grange RW, Joho RH. Pleiotropic effects of a disrupted K<sup>+</sup> channel gene: reduced body weight, impaired motor skill and muscle contraction, but no seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(4):1533-8.
313. Inoue T, Hoshina N, Nakazawa T, Kiyama Y, Kobayashi S, Abe T, et al. LMTK3 deficiency causes pronounced locomotor hyperactivity and impairs endocytic trafficking. *J Neurosci.* 2014;34(17):5927-37.
314. Blumkin L, Kivity S, Lev D, Cohen S, Shomrat R, Lerman-Sagie T, et al. A compound heterozygous missense mutation and a large deletion in the KCTD7 gene presenting as an opsoclonus-myoclonus ataxia-like syndrome. *J Neurol.* 2012;259(12):2590-8.
315. Akakura S, Huang C, Nelson PJ, Foster B, Gelman IH. Loss of the SSeCKS/Gravin/AKAP12 gene results in prostatic hyperplasia. *Cancer Res.* 2008;68(13):5096-103.
316. Howe DG, Wiley JC, McKnight GS. Molecular and behavioral effects of a null mutation in all PKA C beta isoforms. *Mol Cell Neurosci.* 2002;20(3):515-24.
317. Yu S, Michie SA, Lowe AW. Absence of the major zymogen granule membrane protein, GP2, does not affect pancreatic morphology or secretion. *J Biol Chem.* 2004;279(48):50274-9.
318. Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K, et al. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of Dispatched. *Cell.* 2002;111(1):63-75.
319. Hartlage-Rubsamen M, Waniek A, Rossner S. Munc13 genotype regulates secretory amyloid precursor protein processing via postsynaptic glutamate receptors. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(1):36-45.
320. LaCroix-Fralish ML, Mo G, Smith SB, Sotocinal SG, Ritchie J, Austin JS, et al. The beta3 subunit of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase mediates variable nociceptive sensitivity in the formalin test. *Pain.* 2009;144(3):294-302.
321. Ganguly A, Collis L, Devaskar SU. Placental glucose and amino acid transport in calorie-restricted wild-type and Glut3 null heterozygous mice. *Endocrinology.* 2012;153(8):3995-4007.
322. Yu Z, Kryzer TJ, Griesmann GE, Kim K, Benarroch EE, Lennon VA. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. *Ann Neurol.* 2001;49(2):146-54.
323. Nakae Y, Ikeda S, Yamamoto R, Tanaka F, Johkura K. Hemichorea in a thymoma patient without anti-CRMP-5 antibody. *Neurol Sci.* 2014;35(4):629-30.
324. Li J, Patil RV, Verkman AS. Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Muller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(2):573-9.
325. Li J, Verkman AS. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J Biol Chem.* 2001;276(33):31233-7.
326. Rybak IA, Shevtsova NA, Kiehn O. Modelling genetic reorganization in the mouse spinal cord affecting left-right coordination during locomotion. *J Physiol.* 2013;591(22):5491-508.
327. Simion C, Cedano-Prieto ME, Sweeney C. The LRIG family: enigmatic regulators of growth factor receptor signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(6):R431-43.
328. De Filippis B, Lyon L, Taylor A, Lane T, Burnet PW, Harrison PJ, et al.

- The role of group II metabotropic glutamate receptors in cognition and anxiety: comparative studies in GRM2(-/-), GRM3(-/-) and GRM2/3(-/-) knockout mice. *Neuropharmacology*. 2015;89:19-32.
329. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med*. 2005;202(4):473-7.
330. Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Titulaer MJ, Boulos M, Weaver S, Antoine JC, et al. Antibodies to metabotropic glutamate receptor 5 in the Ophelia syndrome. *Neurology*. 2011;77(18):1698-701.
331. Becker EB, Zuliani L, Pettingill R, Lang B, Waters P, Dulneva A, et al. Contactin-associated protein-2 antibodies in non-paraneoplastic cerebellar ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(4):437-40.
332. van Coevorden-Hameete MH, Titulaer MJ, Schreurs MW, de Graaff E, Sillevs Smitt PA, Hoogenraad CC. Detection and Characterization of Autoantibodies to Neuronal Cell-Surface Antigens in the Central Nervous System. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:37.
333. Leypoldt F, Hoftberger R, Titulaer MJ, Armangue T, Gresa-Arribas N, Jahn H, et al. Investigations on CXCL13 in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: a potential biomarker of treatment response. *JAMA Neurol*. 2015;72(2):180-6.
334. Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology*. 2011;77(2):179-89.
335. van Coevorden-Hameete MH, de Graaff E, Titulaer MJ, Hoogenraad CC, Sillevs Smitt PA. Molecular and cellular mechanisms underlying anti-neuronal antibody mediated disorders of the central nervous system. *Autoimmun Rev*. 2014;13(3):299-312.
336. Hoftberger R, Titulaer MJ, Sabater L, Dome B, Rozsas A, Hegedus B, et al. Encephalitis and GABAB receptor antibodies: novel findings in a new case series of 20 patients. *Neurology*. 2013;81(17):1500-6.
337. Kruer MC, Hoftberger R, Lim KY, Coryell JC, Svoboda MD, Woltjer RL, et al. Aggressive course in encephalitis with opsoclonus, ataxia, chorea, and seizures: the first pediatric case of gamma-aminobutyric acid type B receptor autoimmunity. *JAMA Neurol*. 2014;71(5):620-3.
338. Nickerson BG, Hutter JJ, Jr. Opsomyoclonus and neuroblastoma. Response to ACTH. *Clin Pediatr (Phila)*. 1979;18(7):446-8.
339. Berbegall AP, Lopez-Almaraz R, Navarro S, Noguera R. Genetic features of neuroblastic tumors associated with opsoclonus-myoclonus syndrome opens up the possibility for detection in peripheral blood. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(5):465-7.
340. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 1973;33(11):2643-52.
341. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res*. 1989;49(1):219-25.
342. Singh J, Kaur G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res*. 2007;1154:8-21.
343. Khan FH, Pandian V, Ramraj S, Natarajan M, Aravindan S, Herman TS, et al. Acquired genetic alterations in tumor cells dictate the development of high-risk neuroblastoma and clinical outcomes. *BMC Cancer*. 2015;15:514.
344. Peranen J, Rikkinen M, Kaariainen L. A method for exposing hidden antigenic sites in

- paraformaldehyde-fixed cultured cells, applied to initially unreactive antibodies. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(3):447-54.
345. Graus F, Gultekin SH, Ferrer I, Reiriz J, Alberch J, Dalmau J. Localization of the neuronal antigen recognized by anti-Tr antibodies from patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease in the rat nervous system. *Acta Neuropathol.* 1998;96(1):1-7.
346. Helbig AO, Heck AJ, Slijper M. Exploring the membrane proteome--challenges and analytical strategies. *J Proteomics.* 2010;73(5):868-78.
347. Hersh B, Dalmau J, Dangond F, Gultekin S, Geller E, Wen PY. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus associated with anti-Hu antibody. *Neurology.* 1994;44(9):1754-5.
348. Nasri A, Kacem I, Jerdak F, Djebara MB, Mejri N, Sidhom Y, et al. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome revealing dual malignancy. *Neurol Sci.* 2016;37(10):1723-5.
349. Honnorat J, Didelot A, Karantoni E, Ville D, Ducray F, Lambert L, et al. Autoimmune limbic encephalopathy and anti-Hu antibodies in children without cancer. *Neurology.* 2013;80(24):2226-32.
350. Gonzalez C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D, et al. K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol.* 2012;2(3):2087-149.
351. Nowak A, Mathieson HR, Chapman RJ, Janzso G, Yanagawa Y, Obata K, et al. Kv3.1b and Kv3.3 channel subunit expression in murine spinal dorsal horn GABAergic interneurons. *J Chem Neuroanat.* 2011;42(1):30-8.
352. Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G, Leprince D. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.* 1995;6(9):1193-8.
353. Middlebrooks JC, Nick HS, Subramony SH, Advincula J, Rosales RL, Lee LV, et al. Mutation in the kv3.3 voltage-gated potassium channel causing spinocerebellar ataxia 13 disrupts sound-localization mechanisms. *PLoS One.* 2013;8(10):e76749.
354. Subramony SH, Advincula J, Perlman S, Rosales RL, Lee LV, Ashizawa T, et al. Comprehensive phenotype of the p.Arg420his allelic form of spinocerebellar ataxia type 13. *Cerebellum.* 2013;12(6):932-6.
355. Herman-Bert A, Stevanin G, Netter JC, Rascol O, Brassat D, Calvas P, et al. Mapping of spinocerebellar ataxia 13 to chromosome 19q13.3-q13.4 in a family with autosomal dominant cerebellar ataxia and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2000;67(1):229-35.
356. Parolin Schnekenberg R, Perkins EM, Miller JW, Davies WI, D'Adamo MC, Pessia M, et al. De novo point mutations in patients diagnosed with ataxic cerebral palsy. *Brain.* 2015;138(Pt 7):1817-32.
357. Irie T, Matsuzaki Y, Sekino Y, Hirai H. Kv3.3 channels harbouring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells. *J Physiol.* 2014;592(1):229-47.
358. Muona M, Berkovic SF, Dibbens LM, Oliver KL, Maljevic S, Bayly MA, et al. A recurrent de novo mutation in KCNC1 causes progressive myoclonus epilepsy. *Nat Genet.* 2015;47(1):39-46.
359. Nascimento FA, Andrade DM. Myoclonus epilepsy and ataxia due to potassium channel mutation (MEAK) is caused by heterozygous KCNC1 mutations. *Epileptic Disord.* 2016;18(S2):135-8.
360. Chaudhary S, Pak JE, Pedersen BP, Bang LJ, Zhang LB, Ngaw SM, et al. Efficient expression screening of human membrane proteins in transiently transfected Human Embryonic Kidney 293S cells. *Methods.* 2011;55(4):273-80.

361. Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain*. 2010;133(Pt 6):1655-67.
362. Ramberger M, Peschl P, Schanda K, Irschick R, Hoftberger R, Deisenhammer F, et al. Comparison of diagnostic accuracy of microscopy and flow cytometry in evaluating N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in serum using a live cell-based assay. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122037.
363. Crisp SJ, Kullmann DM, Vincent A. Autoimmune synaptopathies. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(2):103-17.
364. Yeung SY, Thompson D, Wang Z, Fedida D, Robertson B. Modulation of Kv3 subfamily potassium currents by the sea anemone toxin BDS: significance for CNS and biophysical studies. *J Neurosci*. 2005;25(38):8735-45.
365. Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*. 2010;90(2):559-605.
366. Pongs O. Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Lett*. 1999;452(1-2):31-5.
367. Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D. K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature*. 1997;387(6636):869-75.
368. Ishikawa T, Nakamura Y, Saitoh N, Li WB, Iwasaki S, Takahashi T. Distinct roles of Kv1 and Kv3 potassium channels at the calyx of Held presynaptic terminal. *J Neurosci*. 2003;23(32):10445-53.
369. Pal S, Hartnett KA, Nerbonne JM, Levitan ES, Aizenman E. Mediation of neuronal apoptosis by Kv2.1-encoded potassium channels. *J Neurosci*. 2003;23(12):4798-802.
370. Marionneau C, LeDuc RD, Rohrs HW, Link AJ, Townsend RR, Nerbonne JM. Proteomic analyses of native brain K(V)4.2 channel complexes. *Channels (Austin)*. 2009;3(4):284-94.
371. Okunuki Y, Usui Y, Takeuchi M, Kezuka T, Hattori T, Masuko K, et al. Proteomic surveillance of autoimmunity in Behcet's disease with uveitis: selenium binding protein is a novel autoantigen in Behcet's disease. *Exp Eye Res*. 2007;84(5):823-31.
372. Bohme MA, Beis C, Reddy-Alla S, Reynolds E, Mampell MM, Grasskamp AT, et al. Active zone scaffolds differentially accumulate Unc13 isoforms to tune Ca(2+) channel-vesicle coupling. *Nat Neurosci*. 2016;19(10):1311-20.
373. Chen Z, Cooper B, Kalla S, Varoqueaux F, Young SM, Jr. The Munc13 proteins differentially regulate readily releasable pool dynamics and calcium-dependent recovery at a central synapse. *J Neurosci*. 2013;33(19):8336-51.
374. Kleopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K<sup>+</sup> channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain*. 2006;129(Pt 6):1570-84.
375. Romi F, Skeie GO, Gilhus NE, Aarli JA. Striational antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance. *Arch Neurol*. 2005;62(3):442-6.
376. Mygland A, Tysnes OB, Matre R, Aarli JA, Gilhus NE. Anti-cardiac ryanodine receptor antibodies in thymoma-associated myasthenia gravis. *Autoimmunity*. 1994;17(4):327-31.
377. Mossman S, Vincent A, Newsom-Davis J. Passive transfer of myasthenia gravis by immunoglobulins: lack of correlation between AChR with antibody bound, acetylcholine receptor loss and transmission defect. *J Neurol Sci*. 1988;84(1):15-28.

378. Horn KE, Glasgow SD, Gobert D, Bull SJ, Luk T, Girgis J, et al. DCC expression by neurons regulates synaptic plasticity in the adult brain. *Cell Rep.* 2013;3(1):173-85.
379. Webber CA, Christie KJ, Cheng C, Martinez JA, Singh B, Singh V, et al. Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2. *Glia.* 2011;59(10):1503-17.
380. Jarjour AA, Bull SJ, Almasieh M, Rajasekharan S, Baker KA, Mui J, et al. Maintenance of axo-oligodendroglial paranodal junctions requires DCC and netrin-1. *J Neurosci.* 2008;28(43):11003-14.
381. van Sonderen A, Arino H, Petit-Pedrol M, Leypoldt F, Kortvelyessy P, Wandinger KP, et al. The clinical spectrum of Caspr2 antibody-associated disease. *Neurology.* 2016;87(5):521-8.
382. Evoli A, Lancaster E. Paraneoplastic disorders in thymoma patients. *J Thorac Oncol.* 2014;9(9 Suppl 2):S143-7.
383. Kondo K, Monden Y. Myasthenia gravis appearing after thymectomy for thymoma. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;28(1):22-5.
384. Suster S, Moran CA. Problem areas and inconsistencies in the WHO classification of thymoma. *Semin Diagn Pathol.* 2005;22(3):188-97.
385. Verghese ET, den Bakker MA, Campbell A, Hussein A, Nicholson AG, Rice A, et al. Interobserver variation in the classification of thymic tumours--a multicentre study using the WHO classification system. *Histopathology.* 2008;53(2):218-23.
386. Marx A, Strobel P, Badve SS, Chalabreysse L, Chan JK, Chen G, et al. ITMIG consensus statement on the use of the WHO histological classification of thymoma and thymic carcinoma: refined definitions, histological criteria, and reporting. *J Thorac Oncol.* 2014;9(5):596-611.
387. Okumura M, Ohta M, Tateyama H, Nakagawa K, Matsumura A, Maeda H, et al. The World Health Organization histologic classification system reflects the oncologic behavior of thymoma: a clinical study of 273 patients. *Cancer.* 2002;94(3):624-32.
388. Strobel P, Bauer A, Puppe B, Kraushaar T, Krein A, Toyka K, et al. Tumor recurrence and survival in patients treated for thymomas and thymic squamous cell carcinomas: a retrospective analysis. *J Clin Oncol.* 2004;22(8):1501-9.
389. Willcox N, Schlupe M, Ritter MA, Schuurman HJ, Newsom-Davis J, Christensson B. Myasthenic and nonmyasthenic thymoma. An expansion of a minor cortical epithelial cell subset? *Am J Pathol.* 1987;127(3):447-60.
390. Maddison P, Lang B. Paraneoplastic neurological autoimmunity and survival in small-cell lung cancer. *J Neuroimmunol.* 2008;201-202:159-62.
391. Bai M, Papoudou-Bai A, Karatzias G, Doukas M, Goussia A, Stefanaki K, et al. Immunohistochemical expression patterns of neural and neuroendocrine markers, the neural growth factor receptors and the beta-tubulin II and IV isoforms in human thymus. *Anticancer Res.* 2008;28(1A):295-303.
392. Blau JN. A phagocytic function of Hassall's corpuscles. *Nature.* 1965;208:564-7.
393. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature.* 2005;436(7054):1181-5.
394. Hill ME, Shiono H, Newsom-Davis J, Willcox N. The myasthenia gravis thymus: a rare source of human autoantibody-secreting plasma cells for testing potential therapeutics. *J Neuroimmunol.* 2008;201-202:50-6.
395. Zhang X, Liu S, Chang T, Xu J, Zhang C, Tian F, et al. Intrathymic Tfh/B

- Cells Interaction Leads to Ectopic GCs Formation and Anti-AChR Antibody Production: Central Role in Triggering MG Occurrence. *Mol Neurobiol.* 2016;53(1):120-31.
396. Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature.* 1996;383(6595):81-5.
397. Strobel P, Chuang WY, Chuvpilo S, Zettl A, Katzenberger T, Kalbacher H, et al. Common cellular and diverse genetic basis of thymoma-associated myasthenia gravis: role of MHC class II and AIRE genes and genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1132:143-56.
398. Fukui Y, Ishimoto T, Utsuyama M, Gytoku T, Koga T, Nakao K, et al. Positive and negative CD4+ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus. *Immunity.* 1997;6(4):401-10.
399. Finnish-German AC. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet.* 1997;17(4):399-403.
400. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet.* 1997;17(4):393-8.
401. Su MA, Anderson MS. Aire: an update. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(6):746-52.
402. Scarpino S, Di Napoli A, Stoppacciaro A, Antonelli M, Pillozzi E, Chiarle R, et al. Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):504-12.
403. Malchow S, Leventhal DS, Lee V, Nishi S, Socci ND, Savage PA. Aire Enforces Immune Tolerance by Directing Autoreactive T Cells into the Regulatory T Cell Lineage. *Immunity.* 2016;44(5):1102-13.
404. Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenahn M, et al. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med.* 2005;202(1):33-45.
405. Hubert FX, Kinkel SA, Davey GM, Phipson B, Mueller SN, Liston A, et al. Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood.* 2011;118(9):2462-72.
406. Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, et al. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol.* 2007;8(4):351-8.
407. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61.
408. Schluep M, Willcox N, Vincent A, Dhoot GK, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study. *Ann Neurol.* 1987;22(2):212-22.
409. Camdessanche JP, Lassabliere F, Meyronnet D, Ferraud K, Absi L, Honnorat J, et al. Expression of the onconeural CV2/CRMP5 antigen in thymus and thymoma. *J Neuroimmunol.* 2006;174(1-2):168-73.
410. Marx A, Porubsky S, Belharazem D, Saruhan-Direskeneli G, Schalke B, Strobel P, et al. Thymoma related myasthenia gravis in humans and potential animal models. *Exp Neurol.* 2015;270:55-65.
411. Meriggioli MN, Sanders DB. Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis? *Expert Rev Clin Immunol.* 2012;8(5):427-38.
412. Gastaut H. [Semeiology of myoclonus and analytic nosology of myoclonic syndromes]. *Rev Neurol (Paris).* 1968;119(1):1-30.

413. Moene Y, Cuche M, Trillet M, Motin J, Michel D. [Diagnostic problems posed by acute chloralose poisoning (6 cases)]. *J Med Lyon*. 1969;50(174):1483-93.
414. Au WJ, Keltner JL. Opsoclonus with amitriptyline overdose. *Ann Neurol*. 1979;6(1):87.
415. Burks JS, Walker JE, Rumack BH, Ott JE. Tricyclic antidepressant poisoning. Reversal of coma, choreoathetosis, and myoclonus by physostigmine. *JAMA*. 1974;230(10):1405-7.
416. White PD. Myoclonus and episodic delirium associated with phenelzine: a case report. *J Clin Psychiatry*. 1987;48(8):340-1.
417. de Souza A, Narvencar KP, Sindhoora KV. The neurological effects of methyl bromide intoxication. *J Neurol Sci*. 2013;335(1-2):36-41.
418. Lucas C, Soetaert G, Leys D, Petit H. [Myoclonus during a course with buflomedil treatment]. *Acta Clin Belg*. 1989;44(5):360-1.
419. Gottwald W. [Transitory healing of psoriais efflorescences during hydantoin poisoning with unusual central nervous symptoms]. *Dermatol Wochenschr*. 1968;154(11):241-51.
420. Uchihara T, Tsukagoshi H. Myoclonic activity associated with cefmetazole, with a review of neurotoxicity of cephalosporins. *Clin Neurol Neurosurg*. 1988;90(4):369-71.
421. Casas M, Garcia-Ribera C, Alvarez E, Udina C, Queralto JM, Grau JM. Myoclonic movements as a side-effect of treatment with therapeutic doses of clomipramine. *Int Clin Psychopharmacol*. 1987;2(4):333-6.
422. Quinio P, Bouche O, Rossignol B, de Tinteniac A. Propofol in the management of myoclonus syndrome induced by chloralose poisoning. *Anesthesiology*. 1995;83(4):875.
423. Ammenti A, Reitter B, Muller-Wiefel DE. Chlorambucil neurotoxicity: report of two cases. *Helv Paediatr Acta*. 1980;35(3):281-7.
424. Taylor JR, Selhorst JB, Houff SA, Martinez AJ. Chlordecone intoxication in man. I. Clinical observations. *Neurology*. 1978;28(7):626-30.
425. Scharf D. Opsoclonus-myoclonus following the intranasal usage of cocaine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989;52(12):1447-8.
426. Dehaene I, Van Vleymen B. Opsoclonus induced by phenytoin and diazepam. *Ann Neurol*. 1987;21(2):216.
427. Garcin MRG, M.; Godlewski, S.T.; Emile, J. Intoxication par le DDT: Syndrome meningoencéphalique aigu regressif avec decharges cloniques diffuses et mouvements désordonnés "en salves" des globes oculaires. *Rev Neurol (Paris)*. 1965;113:559-64.
428. Ng AT. Prolonged myoclonic contractions after enflurane anaesthesia - a case report. *Can Anaesth Soc J*. 1980;27(5):502-3.
429. Mellerio F, Levy-Alcover MA. [Myoclonus of toxic origin]. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin*. 1982;12(3):210-8.
430. Hardin JA, Griggs RC. Diazepam treatment in a case of strychnine poisoning. *Lancet*. 1971;2(7720):372-3.
431. Helmers JH, Adam AA, Giezen J. Pain and myoclonus during induction with etomidate. A double-blind, controlled evaluation of the influence of droperidol and fentanyl. *Acta Anaesthesiol Belg*. 1981;32(2):141-7.
432. Burns RS, Lerner SE, Corrado R, James SH, Schnoll SH. Phencyclidine--states of acute intoxication and fatalities. *West J Med*. 1975;123(5):345-9.
433. Westheimer R, Klawans HL. The role of serotonin in the pathophysiology of myoclonic seizures associated with acute imipramine toxicity. *Neurology*. 1974;24(12):1175-7.
434. Cohen WJ, Cohen NH. Lithium carbonate, haloperidol, and irreversible brain damage. *JAMA*. 1974;230(9):1283-7.

435. Favarel-Garrigues B, Favarel-Garrigues JC, Bourgeois M. [2 cases of severe poisoning by lithium carbonate]. *Ann Med Psychol (Paris)*. 1972;1(2):253-7.
436. Rosen PB, Stevens R. Action myoclonus in lithium toxicity. *Ann Neurol*. 1983;13(2):221-2.
437. Aigner BR, Mulder DW. Myoclonus. Clinical significance and an approach to classification. *Arch Neurol*. 1960;2:600-15.
438. Mack RB. Methaqualone intoxication. *N C Med J*. 1981;42(11):796.
439. Hyser CL, Drake ME, Jr. Myoclonus induced by metoclopramide therapy. *Arch Intern Med*. 1983;143(11):2201-2.
440. Reutens DC, Stewart-Wynne EG. Norpethidine induced myoclonus in a patient with renal failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989;52(12):1450-1.
441. Pullicino P, Aquilina J. Opsoclonus in organophosphate poisoning. *Arch Neurol*. 1989;46(6):704-5.
442. Chaptal J, Jean R, Labauge R, Bonnet H, Aghai E. [Oppositional myoclonus caused by piperazine poisoning]. *Arch Fr Pediatr*. 1963;20:17-23.
443. Madigand M, Dien J, Pavin G, Allain H. [Myoclonic encephalopathy probably attributable to propafenone]. *Presse Med*. 1988;17(11):538.
444. Supino-Viterbo V, Sicard C, Risvegliato M, Rancurel G, Buge A. Toxic encephalopathy due to ingestion of bismuth salts: clinical and EEG studies of 45 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1977;40(8):748-52.
445. Bowdle TA. Myoclonus following sufentanil without EEG seizure activity. *Anesthesiology*. 1987;67(4):593-5.
446. Maccario M, Seelinger D, Snyder R. Thallotoxicosis with coma and abnormal eye movements (opsoclonus): Clinical and EEG correlations. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1975;38:98.
447. Lazar RB, Ho SU, Melen O, Daghestani AN. Multifocal central nervous system damage caused by toluene abuse. *Neurology*. 1983;33(10):1337-40.
448. Syrbe S, Merckenschlager A, Bernhard MK, Grosche J, Liebert UG, Hirsch W, et al. Opsoclonus-myoclonus syndrome after adenovirus infection. *Springerplus*. 2015;4:636.
449. Peter L, Jung J, Tilikete C, Ryvlin P, Mauguire F. Opsoclonus-myoclonus as a manifestation of Lyme disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(9):1090-1.
450. Zaganas I, Prinianakis G, Xirouchaki N, Mavridis M. Opsoclonus-myoclonus syndrome associated with cytomegalovirus encephalitis. *Neurology*. 2007;68(19):1636.
451. Tabarki B, Palmer P, Lebon P, Sebire G. Spontaneous recovery of opsoclonus-myoclonus syndrome caused by enterovirus infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;64(3):406-7.
452. Kuban KC, Ephros MA, Freeman RL, Laffell LB, Bresnan MJ. Syndrome of opsoclonus-myoclonus caused by Cocksackie B3 infection. *Ann Neurol*. 1983;13(1):69-71.
453. Mustafa M, Levin J, Schoberl F, Rominger A. Postinfectious Opsoclonus-Myoclonus Syndrome in a 41-Year-Old Patient-Visualizing Hyperactivation in Deep Cerebellar Nuclei by Cerebral [(18)F]-FDG- PET. *J Neuroimaging*. 2015;25(4):683-5.
454. Herve F, Soulier J, Berger JP. [Opso-myoclonic syndrome and Cocksackie B3]. *Arch Fr Pediatr*. 1988;45(8):597-8.
455. Narita M. Classification of Extrapulmonary Manifestations Due to Mycoplasma pneumoniae Infection on the Basis of Possible Pathogenesis. *Front Microbiol*. 2016;7:23.
456. Huici M, de la Torre N, Perez-Duenas B, Ricart S, Noguera-Julian A.

- [Acute Mycoplasma pneumoniae infection-associated opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome]. *An Pediatr (Barc)*. 2013;79(6):397-8.
457. Singh D, Sinha M, Kumar R, Shukla R, Ahuja RC. Opsoclonus-myoclonus syndrome caused by varicella-zoster virus. *Ann Indian Acad Neurol*. 2010;13(3):211-2.
458. Benmansour Y, Manaf S, El Moutawakil B, Rafai MA, Slassi I. [Opsoclonus-myoclonus syndrome associated with leptospirosis]. *Rev Neurol (Paris)*. 2013;169(6-7):523-4.
459. Pongvarin N, Praditsuwan R. Opsoclonus in malaria: the first report in the literature. *J Med Assoc Thai*. 1990;73(8):462-6.
460. Asindi AA, Bell EJ, Browning MJ, Stephenson JB. Vaccine-induced poliоencephalomyelitis in Scotland. *Scott Med J*. 1988;33(4):306-7.
461. Blue SK, Janeway R, Stanley JA. Opsoclonus and body tremulousness: a case report with suggested cause. *Trans Am Neurol Assoc*. 1971;96:208-10.
462. Christoff N. Myoclonic encephalopathy of infants. A report of two cases and observations on related disorders. *Arch Neurol*. 1969;21(3):229-34.
463. Kang BH, Kim JI. Opsoclonus-myoclonus syndrome associated with mumps virus infection. *J Clin Neurol*. 2014;10(3):272-5.
464. Vejajjiva A, Lerdverasirikul P. Opsoclonus in salmonella infection. *Br Med J*. 1977;2(6097):1260.
465. Dassan P, Clarke C, Sharp DJ. A case of poststreptococcal opsoclonus-myoclonus syndrome. *Mov Disord*. 2007;22(10):1490-1.
466. Verma A, Brozman B. Opsoclonus-myoclonus syndrome following Epstein-Barr virus infection. *Neurology*. 2002;58(7):1131-2.
467. Tan AH, Linn K, Sam IC, Tan CT, Lim SY. Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome associated with dengue virus infection. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015;21(2):160-1.
468. Tan AH, Linn K, Ramli NM, Hlaing CS, Aye AM, Sam IC, et al. Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome associated with dengue virus infection. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014;20(11):1309-10.
469. Evans RW, Welch K. Opsoclonus in a confirmed case of St. Louis encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1982;45(7):660-1.
470. Southern PM, Jr., Smith JW, Luby JP, Barnett JA, Sanford JP. Clinical and laboratory features of epidemic St. Louis encephalitis. *Ann Intern Med*. 1969;71(4):681-9.
471. Ertekin V, Tan H. Opsoclonus-myoclonus syndrome attributable to hepatitis C infection. *Pediatr Neurol*. 2010;42(6):441-2.
472. Kanjanasut N, Phanthumchinda K, Bhidayasiri R. HIV-related opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome: report on two cases. *Clin Neurol Neurosurg*. 2010;112(7):572-4.
473. Scott KM, Parker F, Heckmann JM. Opsoclonus-myoclonus syndrome and HIV-infection. *J Neurol Sci*. 2009;284(1-2):192-5.
474. Birlutiu V, Birlutiu RM. Opsoclonus-myoclonus syndrome attributable to West Nile encephalitis: a case report. *J Med Case Rep*. 2014;8:232.
475. Morita A, Ishihara M, Kamei S, Ishikawa H. Opsoclonus-myoclonus syndrome following influenza A infection. *Intern Med*. 2012;51(17):2429-31.
476. Kumar N, Singh S. Opsoclonus in tuberculous meningitis. *J Assoc Physicians India*. 1989;37(5):353-4.
477. Kearsley JH, Johnson P, Halmagyi GM. Paraneoplastic cerebellar disease. Remission with excision of the primary tumor. *Arch Neurol*. 1985;42(12):1208-10.
478. Nausieda PA, Tanner CM, Weiner WJ. Opsoclonic cerebellopathy: A paraneoplastic syndrome responsive to

- thiamine. *Arch Neurol.* 1981;38(12):780-1.
479. Maranhao MV, de Holanda AC, Tavares FL. Kinsbourne syndrome: case report. *Braz J Anesthesiol.* 2013;63(3):287-9.
480. Rossor AM, Perry F, Botha A, Norwood F. Opsoclonus myoclonus syndrome due to squamous cell carcinoma of the oesophagus. *BMJ Case Rep.* 2014;2014.
481. De Luca S, Terrone C, Crivellaro S, De Zan A, Polo P, Vigliani MC, et al. Opsoclonus-myoclonus syndrome as a paraneoplastic manifestation of renal cell carcinoma. a case report and review of the literature. *Urol Int.* 2002;68(3):206-8.
482. Vigliani MC, Palmucci L, Polo P, Mutani R, Schiffer D, De Luca S, et al. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus associated with renal cell carcinoma and responsive to tumour ablation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;70(6):814-5.
483. Kilgo GR, Schwartze GM. Opsoclonus. Update on clinical and pathologic associations. *J Clin Neuroophthalmol.* 1984;4(2):109-13.
484. Taib BG, Kinshuck AJ, Milburn-McNulty P, Frataglia L, Forsyth L, Husband D, et al. Opsoclonus-myoclonus syndrome associated with a nasopharyngeal tumor in an adult: a case report. *J Med Case Rep.* 2015;9:128.
485. Corapcioglu F, Mutlu H, Kara B, Inan N, Akansel G, Gurbuz Y, et al. Response to rituximab and prednisolone for opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in a child with ganglioneuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol.* 2008;25(8):756-61.
486. Gambini C, Conte M, Bernini G, Angelini P, Pession A, Paolucci P, et al. Neuroblastic tumors associated with opsoclonus-myoclonus syndrome: histological, immunohistochemical and molecular features of 15 Italian cases. *Virchows Arch.* 2003;442(6):555-62.
487. Keane JR, Devereaux MW. Opsoclonus associated with an intracranial tumor. A clinicopathologic case report. *Arch Ophthalmol.* 1974;92(5):443-5.
488. Gold CA, Lassman AB, Odia Y. Opsoclonus-myoclonus syndrome in a patient with an anaplastic oligoastrocytoma. *J Neurooncol.* 2015;123(2):315-6.
489. Martin ES, Griffith JF. Myoclonic encephalopathy and neuroblastoma. Report of a case with apparent recovery. *Am J Dis Child.* 1971;122(3):257-8.
490. Leonidas JC, Brill CB, Aron AM. Neuroblastoma presenting with myoclonic encephalopathy. *Radiology.* 1972;102(1):87-8.
491. Forster C, Weinmann H. [Symptomatic infantile polymyoclonus]. *Z Kinderheilkd.* 1971;111(3):240-6.
492. Solomon GE, Chutorian AM. Opsoclonus and occult neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1968;279(9):475-7.
493. Blaes F, Dharmalingam B. Childhood opsoclonus-myoclonus syndrome: diagnosis and treatment. *Expert Rev Neurother.* 2016;16(6):641-8.
494. Bray PF, Ziter FA, Lahey ME, Myers GG. The coincidence of neuroblastoma and acute cerebellar encephalopathy. *J Pediatr.* 1969;75(6):983-90.
495. Kinast M, Levin HS, Rothner AD, Erenberg G, Wacksman J, Judge J. Cerebellar ataxia, opsoclonus, and occult neural crest tumor. Abdominal computerized tomography in diagnosis. *Am J Dis Child.* 1980;134(11):1057-9.
496. Keating JW, Cromwell LD. Remote effects of neuroblastoma. *AJR Am J Roentgenol.* 1978;131(2):299-303.
497. Wilfong AA, Parke JT, McCrary JA, 3rd. Opsoclonus-myoclonus with Beckwith-Wiedemann syndrome and hepatoblastoma. *Pediatr Neurol.* 1992;8(1):77-9.
498. Tsuzaka K, Aimoto Y, Minami N, Moriwaka F, Tashiro K. [A case of primary intracranial malignant lymphoma presenting opsoclonus-polymyoclonia syndrome]. *Rinsho Shinkeigaku.* 1993;33(2):194-8.

499. Grubbs J, Jr., Trobe JD, Fisher-Hubbard A. Opsoclonus-Myoclonus Syndrome in Primary Central Nervous System Lymphoma. *J Neuroophthalmol.* 2016;36(4):408-11.
500. Kay CL, Davies-Jones GA, Singal R, Winfield DA. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus in Hodgkin's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993;56(7):831-2.
501. Jung KY, Youn J, Chung CS. Opsoclonus-myoclonus syndrome in an adult with malignant melanoma. *J Neurol.* 2006;253(7):942-3.
502. Rubio Nazabal E, Marey Lopez J, Alvarez Perez P, Lopez Facal S, Alonso Magdalena L. [Opsoclonus-myoclonus syndrome in patient with ovarian cancer]. *An Med Interna.* 2003;20(7):370-2.
503. Kanno K, Kin S, Hirose M, Suzuki S, Watanabe T, Fujimori K. Opsoclonus-ataxia syndrome associated with ovarian mature teratoma. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015;41(7):1149-53.
504. Laroumagne S, Elharrar X, Coiffard B, Plojoux J, Dutau H, Breen D, et al. "Dancing eye syndrome" secondary to opsoclonus-myoclonus syndrome in small-cell lung cancer. *Case Rep Med.* 2014;2014:545490.
505. Nadal E, Bruna J, Ochoa de Olza M, Antonio M, Cardenal F. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus syndrome as a new and single manifestation of relapsing disease in a patient with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6(5):968-9.
506. Sharma C, Acharya M, Kumawat BL, Kochar A. 'Dancing eyes, dancing feet syndrome' in small cell lung carcinoma. *BMJ Case Rep.* 2014;2014.
507. Karasaki T, Tanaka M. Opsoclonus-myoclonus syndrome associated with non-small cell lung cancer. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2015;23(9):1113-5.
508. Musunuru K, Kesari S. Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus ataxia associated with non-small-cell lung carcinoma. *J Neurooncol.* 2008;90(2):213-6.
509. Toupet M, de Gramont A, Bacri D, Haguenu M, Pepin B. [Flutter-opsoclonus: report on three cases (author's transl)]. *Rev Neurol (Paris).* 1982;138(3):219-39.
510. Yamaguchi Y, Wada M, Tanji H, Kurokawa K, Kawanami T, Ohtake H, et al. Marked improvement in opsoclonus and cerebellar ataxia after the surgical removal of a squamous cell carcinoma of the thymus: a case report. *J Neurol Sci.* 2013;325(1-2):156-9.
511. Morita H, Hirota T, Mune T, Suwa T, Ishizuka T, Inuzuka T, et al. Paraneoplastic neurologic syndrome and autoimmune Addison disease in a patient with thymoma. *Am J Med Sci.* 2005;329(1):48-51.
512. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2015.
513. Jaretzki A, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keesey JC, Penn AS, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology.* 2000;55(1):16-23.

## ***PUBLICACIONES***



- Netrin-1 receptor antibodies in thymoma-associated neuromyotonia with myasthenia gravis. **Torres-Vega E**, Mancheño N, Cebrián-Silla A, Herranz-Pérez V, Chumillas MJ, Moris G, Joubert B, Honnorat J, Sevilla T, Vílchez JJ, Dalmau J, Graus F, García-Verdugo JM, Bataller L. *Neurology*. 2017 Mar 28;88(13):1235-1242. doi: 10.1212/WNL.0000000000003778. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28251919
  
- Immunoproteomic studies on paediatric opsoclonus-myoclonus associated with neuroblastoma. **Torres-Vega E**, Durán-Moreno M, Sánchez Del Pino M, Yáñez Y, Cañete A, Castel V, López-Cuevas R, Vílchez JJ, Dalmau J, Graus F, García Verdugo JM, Bataller L. *J Neuroimmunol*. 2016 Aug 15;297:98-102. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.05.015. Epub 2016 May 25. PMID: 27397082

