

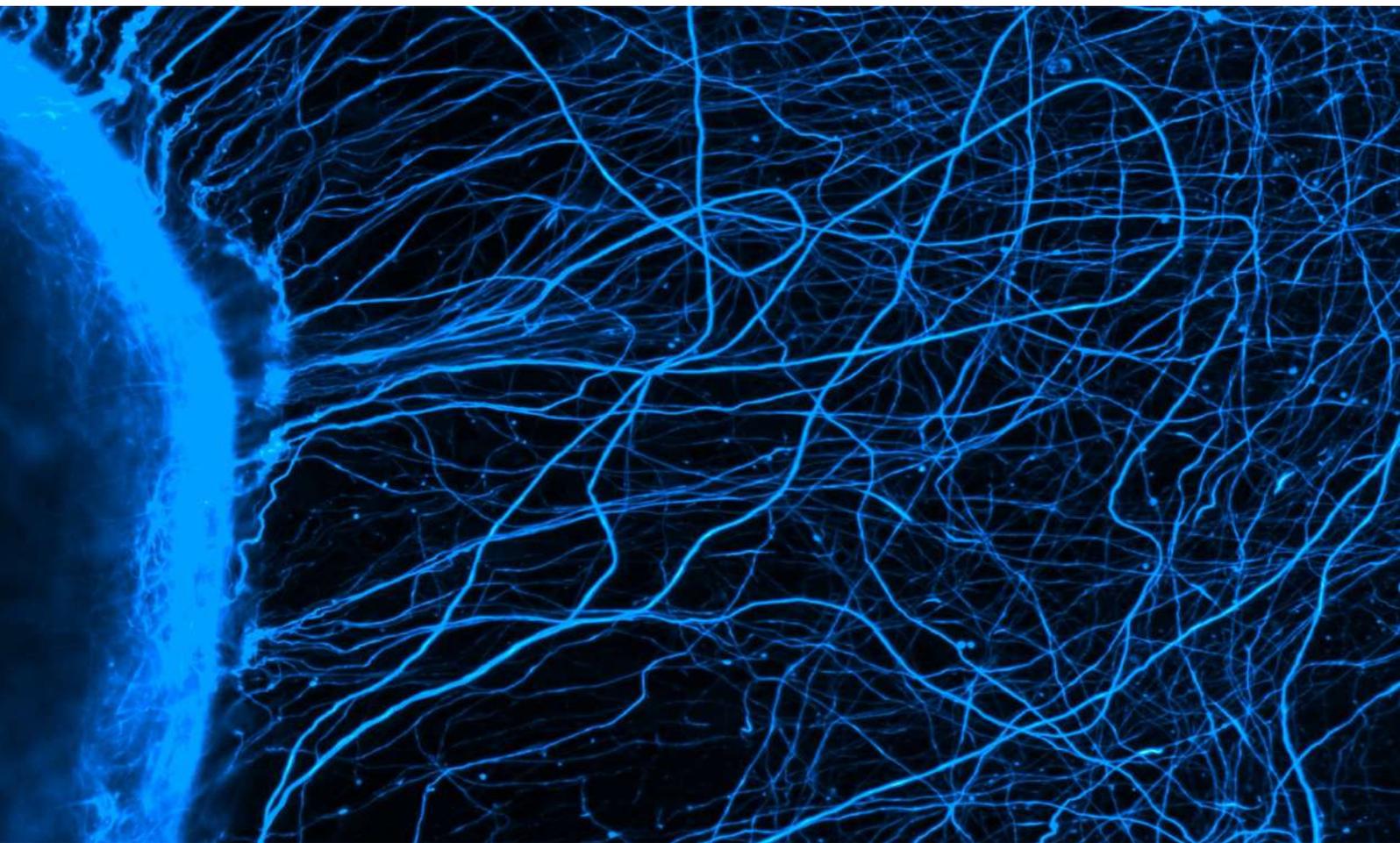
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

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

TESIS DOCTORAL

DETECCIÓN DE NUEVOS AUTOANTICUERPOS EN NEUROPATÍAS INFLAMATORIAS



Marta Caballero Ávila
Universitat Autònoma de Barcelona

2025

TESIS DOCTORAL

**DETECCIÓN DE NUEVOS
AUTOANTICUERPOS EN
NEUROPATÍAS INFLAMATORIAS**

Autora: Marta Caballero Ávila

Directores: Dr. Luis Antonio Querol Gutiérrez

Dra. Maria Cinta Lleixà Rodríguez

Tutor: Dr. Daniel Alcolea Rodríguez

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

2025

AGRADECIMIENTOS

Gracias en primer lugar a Luis, por darme la oportunidad de trabajar en este equipo. Por apostar por mi desde un principio y por ser tan generoso a la hora de compartir tus conocimientos y tu tiempo. Por enseñarme todo lo que sé de investigación, por ser cercano y estar disponible para todo y a cualquier hora.

Gràcies a la Cinta, per tenir la paciència i la dedicació d'ensenyar-me tot el que se de laboratori, per solucionar-ho tot amb un somriure i per ser tan endreçada i metòdica. Ha sigut molt divertit tenir una amiga de directora de tesi.

Gracias a Elba y Lorena, por ser mis becarias mayores, por adoptarme como una más del grupo desde que llegué, y por acompañarme y guiarme tanto en la clínica como en la investigación. Trabajar con amigas y de esta manera me hace feliz.

Gràcies a tota la unitat de Neuromuscular, a la Montse, al Ricard, a la Janina i a l'Elena per ensenyar-me tot el que sabeu i transmetre'm el rigor i la passió per la feina ben feta. També al grup jove de neuromuscular, a la Laura, a l'Ana, al Roger i a la Clara, per fer pinya i fer-nos costat i ajudar-nos quan ho necessitem. Pero especialmente a Álvaro, porque juntos iniciamos esta carrera de fondo y has sido un apoyo muy importante para mí.

Gràcies a la Marina, per tots aquests anys juntes, per guiar-me com a R gran des de l'inici i ara com una de les meves millors amigues. Espero que puguem compartir molts anys més d'esmorzars i no marxis molt més lluny del despatx del costat.

Gracias a mi familia, a mis padres y hermanos. A mamá, por transmitirme la pasión por la neurología y por leerte todos mis trabajos. Está claro que si no fuera por ti yo no sería neuróloga. A papá por tu serenidad y sentido del humor, que relativiza todos los problemas. Y a Pepe, Anna y Pau por tener paciencia con vuestra hermana mayor, por admirar lo que hago y por hacer tan divertido nuestro refugio.

Gràcies a en Tomàs, per ser-hi sempre, per acompanyar-me, escoltar-me i entendre'm quan més ho necessito. Per sempre confiar en mi, i per tenir fe cega en el que estic fent. Per encarregar-te de tot quan necessito temps i per fer-ho sempre somrient. Sense tu això no hagués estat possible.

I a l'Èlia, per donar-me temps, energia i felicitat per acabar aquesta feina. Un dia t'explicarem que vas venir a veure la mama llegir la tesi amb pocs mesos de vida.

ABREVIATURAS

BHN: barrera hemato-nerviosa

CAM: molécula de adhesión celular

Caspr1: proteína asociada a contactin-1

CIDP: polirradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante crónica

CMAP: potencial de acción muscular compuesto

CNTN1: contactin-1

CNTN2: contactin-2

CS: célula de Schwann

DADS: neuropatía desmielinizante adquirida distal simétrica

DLAT: dihidrolipamida S-acetiltransferasa

EFNS/PNS: European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society

Fab: antigen binding fragment

Fc: crystalline fragment

FcRn: receptor neonatal del fragmento Fc de las inmunoglobulinas

FDA: Food and Drug Administration

HEK: células embrionarias de riñón humano

IgEV: inmunoglobulinas endovenosas

IgG: inmunoglobulina G

IgSC: inmunoglobulinas subcutáneas

IP: inmunoprecipitación

LGI4: leucine-rich glioma-inactivated family member 4

LCR: líquido cefalorraquídeo

LIF: leukemia inhibitor factor

LIN: límite inferior de la normalidad

LSN: límite superior de la normalidad

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NfH: neurofilamentos de cadena pesada

NfL: neurofilamentos de cadena ligera

NfM: neurofilamentos de cadena media

NF140/186: neurofascina 140/186

NF155: neurofascina-155

NMM: neuropatía motora multifocal

NoA: nodopatías autoinmunes

PhIP-seq: inmunoprecipitación con fagos

PMP2: proteína de la mielina periférica 2

PMP22: proteína de la mielina periférica 22

RM: resonancia magnética

SGB: síndrome de Guillain-Barré

sNFL: neurofilamentos de cadena ligera en suero

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

WB: Western Blot

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. EL NERVIO PERIFÉRICO	19
1.1.1. Anatomía del nervio periférico y tipos de fibras nerviosas	19
1.1.2. Estructura de las fibras mielinizadas	20
1.2. INMUNOLOGÍA DEL NERVIO PERIFÉRICO	22
1.2.1. Inmunidad celular	23
1.2.2. Inmunidad humoral: los anticuerpos.....	24
1.2.2.1 Generalidades de los anticuerpos.....	25
1.2.2.2. Técnicas de detección de nuevos autoanticuerpos	26
1.2.2.2.1. Técnica del antígeno candidato	26
1.2.2.2.2. Inmunoprecipitación clásica	26
1.2.2.2.3. Inmunoprecipitación con fagos.....	27
1.2.2.2.4. Microarrays de proteínas.....	29
1.3. NEUROPATÍAS AUTOINMUNES	30
1.3.1. Polirradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante crónica (CIDP).....	31
1.3.1.1. Características clínicas de la CIDP y sus variantes	31
1.3.1.2. Diagnóstico de la CIDP	33
1.3.1.3. Anticuerpos en CIDP	34
1.3.1.4. Tratamiento de la CIDP.....	35
1.3.2. Nodopatías autoinmunes.....	36
1.3.2.1. Características clínicas de las nodopatías autoinmunes	36
1.3.2.2. Patogenicidad de los anticuerpos en NoA	39
1.3.2.3. Tratamiento y seguimiento en nodopatías autoinmunes	40
1.4. BIOMARCADORES EN NEUROPATÍAS AUTOINMUNES.....	41

1.4.1. Autoanticuerpos como biomarcadores en neuropatías autoinmunes	41
1.4.2. Biomarcadores de daño axonal	42
1.4.2.1. Neurofilamentos de cadena ligera	43
1.4.2.2. Otros biomarcadores de daño axonal	44
1.4.3. Biomarcadores de daño mielínico.....	45
1.5. EL FUTURO DE LAS NEUROPATÍAS AUTOINMUNES	46
2. HIPÓTESIS.....	49
3. OBJETIVOS	53
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL	53
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	53
4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES	57
4.1. ARTÍCULO 1.	57
4.2. ARTÍCULO 2.	75
5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....	93
6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN	99
7. CONCLUSIONES.....	105
8.LÍNEAS DE FUTURO	109
9. BIBLIOGRAFÍA.....	111

RESUMEN

Los autoanticuerpos tienen un papel crucial en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes, incluyendo las neuropatías inflamatorias, como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP). La descripción de anticuerpos contra proteínas del nodo de Ranvier en un subgrupo de pacientes que cumplían criterios diagnósticos de CIDP, ha desembocado en la definición de una nueva categoría diagnóstica: las nodopatías autoinmunes (NoA). Las NoA tienen un fenotipo clínico característico y una respuesta selectiva a terapias inmunomoduladoras. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito un autoanticuerpo específico asociado con la mayoría de casos de CIDP, y los datos sobre los pacientes con autoanticuerpos conocidos son escasos.

Membrane proteome-wide screening of autoantibodies in CIDP using human cell microarray technology

Marta Caballero-Ávila, Cinta Lleixà, Elba Pascual-Goñi, Lorena Martín-Aguilar, Núria Vidal-Fernandez, Clara Tejada-Illa, Roger Collet-Vidiella, Ricardo Rojas-Garcia, Elena Cortés-Vicente, Janina Turon-Sans, Eduard Gallardo, Montse Olivé, Ana Vesperinas, Álvaro Carbayo, Laura Llansó, Laura Martínez-Martínez, Anthony Shock, Louis Christodoulou, Benjamin Dizier, Jim Freeth, Jo Soden, Sarah Dawson, Luis Querol.

La identificación de nuevos autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes complejas como la CIDP mediante el uso de diversas tecnologías y enfoques experimentales es el objetivo de múltiples grupos de investigación. Hasta la fecha se han descrito anticuerpos contra diferentes proteínas del nervio, la mayoría de ellos antígenos de membrana. Recientemente ha aparecido una nueva técnica, el microarray celular, que consiste en expresar un gran número de proteínas (>5000) en la membrana de células humanas, para posteriormente estudiar sus interacciones.

En este estudio se evaluó la utilidad de un microarray celular de antígenos de superficie (Retrogenix) para detectar nuevos autoanticuerpos en CIDP. En primer lugar, se validó la técnica mediante el análisis de 4 sueros con anticuerpos conocidos (anti-contactin-1, anti-neurofascin-155, anti-caspr1 y anti-neurofascin-140/186). Posteriormente se incubaron suero de ocho pacientes con CIDP en la plataforma, identificándose nueve posibles antígenos relevantes, de los cuales seis fueron confirmados mediante inmunocitoquímica de células transfectadas y/o ELISA.

Los antígenos confirmados se testaron en una cohorte de pacientes con CIDP o NoA (n=96) y sueros control (n=100). Por un lado, se detectaron anticuerpos contra ATP4A/4B y EPHA7 pero estaban presentes tanto en pacientes como en controles, por lo que se consideraron inespecíficos. En cambio, se detectaron anticuerpos contra el *leukemia inhibitory factor* (LIF) y contra interferon lambda 1-3 (IFNL) exclusivamente en dos pacientes (1 CIDP y 1 NoA). Además, ambos sueros de estos pacientes presentaban reactividad contra mielina de nervio periférico, lo que sugiere una posible asociación patológica. No obstante, dichos anticuerpos no se asociaban a características clínicas específicas, por lo que investigaciones futuras dilucidarán su relevancia clínica.

Conclusión: Este estudio demuestra la utilidad de un microarray celular para detectar anticuerpos en suero. Se detectaron dos potenciales nuevos autoanticuerpos en CIDP (LIF/IFNL), aunque su relevancia clínica y patogénica es incierta.

Long-Term Follow Up in Anti- Contactin-1 Autoimmune Nodopathy

Marta Caballero-Ávila, Lorena Martín-Aguilar , Elba Pascual-Goñi , Milou R. Michael, Marleen J.A. Koel-Simmelink, Romana Höftberger , Julia Wanschitz, Alicia Alonso-Jiménez, Thais Armangué , Adaja Elisabeth Baars, Álvaro Carbayo , Barbara Castek, Roger Collet-Vidiella, Jonathan De Winter, María Ángeles del Real, Emilien Delmont, Luca Diamanti, Pietro Emiliano Doneddu, Fu Liong Hiew, Eduard Gallardo, Amaia Gonzalez, Susanne Grinzinger, Alejandro Horga, Stephan Iglseder, Bart C. Jacobs, Amaia Jauregui, Joep Killestein, Elisabeth Lindeck Pozza, Laura Martínez-Martínez, Eduardo Nobile-Orazio, Nicolau Ortiz, Helena Pérez-Pérez, Kai-Nicolas Poppert, Paolo Ripellino, Jose Carlos Roche, Francisco Javier Rodriguez de Rivera, Kevin Rostasy, Davide Sparasci , Clara Tejada-Illa, Charlotte C.E. Teunissen, Elisa Vegezzi, Tomàs Xuclà-Ferrarons, Fabian Zach, Luuk Wieske, Filip Eftimov, Cinta Lleixà, Luis Querol.

La proteína contactin-1 (CNTN1) es una proteína axonal localizada en la región paranodal del nervio periférico. Autoanticuerpos frente a CNTN1 se describieron en un subgrupo de pacientes que cumplían criterios diagnósticos de CIDP. Actualmente, estos pacientes se engloban en la categoría diagnóstica de NoA, junto con otros pacientes con anticuerpos dirigidos contra diferentes proteínas del nodo de Ranvier.

En este estudio se analizaron las características clínicas y biomarcadores de pacientes con NoA anti-CNTN1. Se incluyeron 31 pacientes, y se recopilaron de forma retrospectiva información clínica, respuesta a tratamiento y seguimiento a largo plazo. Además, se

analizaron los títulos de autoanticuerpos, neurofilamentos de cadena ligera en suero (sNfL) y CNTN1 soluble (sCNTN1) en muestras iniciales y de seguimiento.

Los pacientes presentaban predominantemente una neuropatía sensitivo-motora progresiva, con afectación proximal y distal, ataxia y una discapacidad severa. Un 35% mostró afectación renal. Respecto a los tratamientos, las inmunoglobulinas endovenosas y los corticoides fueron escasamente eficaces. El tratamiento con rituxumab demostró una alta tasa de respuesta, logrando la remisión clínica en la mayoría de los pacientes con un solo ciclo. Solo un 12,9% de los pacientes sufrió recaídas tras una mediana de 25 meses de seguimiento.

Respecto a los biomarcadores, los títulos de anticuerpos anti-CNTN1 se correlacionaron con la gravedad clínica en el momento de extracción de la muestra, y negativizaron tras el tratamiento efectivo en todos los pacientes menos en uno. Los niveles de sNfL fueron significativamente más elevados y los de sCNTN1 más bajos en pacientes anti-CNTN1 en comparación con controles sanos. Ambos biomarcadores se normalizaron tras un tratamiento exitoso.

Conclusión: los pacientes con NoA anti-CNTN1 presentan un perfil clínico característico y una respuesta excelente y duradera al tratamiento con rituximab, Además, los anticuerpos anti-CNTN1, sNfL y sCNTN1 se presentan como biomarcadores útiles para el seguimiento de la enfermedad.

ABSTRACT

Autoantibodies play a crucial role in the pathophysiology of several inflammatory neuropathies, including chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP). The identification of antibodies targeting proteins at the node of Ranvier in a subset of patients meeting CIDP diagnostic criteria has led to the recognition of a new diagnostic category: autoimmune nodopathies. These are characterized by a distinct clinical phenotype and a selective response to specific immunomodulatory therapies. However, to date, the target antigen(s) remain unknown in the majority of patients with CIDP.

Membrane proteome-wide screening of autoantibodies in CIDP using human cell microarray technology

Marta Caballero-Ávila, Cinta Lleixà, Elba Pascual-Goñi, Lorena Martín-Aguilar, Núria Vidal-Fernandez, Clara Tejada-Illa, Roger Collet-Vidiella, Ricardo Rojas-Garcia, Elena Cortés-Vicente, Janina Turon-Sans, Eduard Gallardo, Montse Olivé, Ana Vesperinas, Álvaro Carbayo, Laura Llansó, Laura Martínez-Martínez, Anthony Shock, Louis Christodoulou, Benjamin Dizier, Jim Freeth, Jo Soden, Sarah Dawson, Luis Querol.

The identification of novel autoantibodies in complex autoimmune diseases such as CIDP has been an important topic of research for decades. Diverse technologies and experimental approaches have been used. One of the most recent developments is the human cell microarray, which involves the expression of a large number of proteins (>5,000) in human cells to subsequently study their interactions.

In this study, the utility of a human cell microarray technology (Retrogenix) to detect novel autoantibodies in CIDP was evaluated. First, the technique was validated by analyzing four sera containing known autoantibodies (anti-contactin-1, anti-neurofascin-155, anti-Caspr1, and anti-neurofascin-140/186). Subsequently, sera from eight patients with CIDP were incubated on the platform, resulting in the identification of nine potentially relevant antigens. From them, six antigens were confirmed by immunocytochemistry cell-based assays and/or ELISA.

Antigens confirmed were then analyzed in 96 patients (with CIDP or autoimmune nodopathy) and 100 controls. Among the antigens identified, antibodies against ATP4A/4B and EPHA7 were found in both patients and controls and thus considered nonspecific. In contrast, antibodies targeting leukemia inhibitory factor (LIF) and interferon lambda 1–3 (IFNL) were detected exclusively in two patients (one with CIDP and one with autoimmune

nodopathy). Moreover, both patients exhibited similar reactivity against peripheral nerve myelin, suggesting a potential pathogenic association. However, no clear clinical correlations could be established, and further investigation is required to clarify the relevance of these autoantibodies.

Conclusion: This study demonstrates the utility of the human cell microarray for the detection of serum autoantibodies. Two potential CIDP-related antigens (anti-LIF and anti-IFNL) were identified, although their clinical and pathogenic significance remains unknown.

Long-Term Follow Up in Anti- Contactin-1 Autoimmune Nodopathy

Marta Caballero-Ávila, Lorena Martín-Aguilar , Elba Pascual-Goñi , Milou R. Michael, Marleen J.A. Koel-Simmelink, Romana Höftberger , Julia Wanschitz, Alicia Alonso-Jiménez, Thais Armangué , Adaja Elisabeth Baars, Álvaro Carbayo , Barbara Castek, Roger Collet-Vidiella, Jonathan De Winter, Maria Ángeles del Real, Emilien Delmont, Luca Diamanti, Pietro Emiliano Doneddu, Fu Liang Hiew, Eduard Gallardo, Amaia Gonzalez, Susanne Grinzinger, Alejandro Horga, Stephan Iglseder, Bart C. Jacobs, Amaia Jauregui, Joep Killestein, Elisabeth Lindeck Pozza, Laura Martínez-Martínez, Eduardo Nobile-Orazio, Nicolau Ortiz, Helena Pérez-Pérez, Kai-Nicolas Poppert, Paolo Ripellino, Jose Carlos Roche, Francisco Javier Rodriguez de Rivera, Kevin Rostasy, Davide Sparasci , Clara Tejada-Illa, Charlotte C.E. Teunissen, Elisa Vegezzi, Tomàs Xuclà-Ferrarons, Fabian Zach, Luuk Wieske, Filip Eftimov, Cinta Lleixà, Luis Querol.

Contactin-1 (CNTN1) is an axonal protein located in the paranodal region of peripheral nerves. Autoantibodies against CNTN1 have been described in a group of patients fulfilling CIDP diagnostic criteria. These patients are now classified under a new diagnostic category: autoimmune nodopathies.

This study analyzes the clinical features and biomarkers of patients with anti-CNTN1 autoimmune nodopathy. Thirty-one patients were included, and retrospective data on clinical presentation, treatment response, and long-term follow-up were collected. In addition, we measured autoantibody titers, serum neurofilament light chain (sNfL), and serum CNTN1 (sCNTN1) levels in baseline and follow-up samples.

Patients predominantly presented with a progressive sensorimotor neuropathy affecting both proximal and distal segments, sensory ataxia, and severe disability. Renal involvement was observed in 35% of cases. Intravenous immunoglobulin and corticosteroids were

generally ineffective. In contrast, treatment with rituximab showed a high response rate, leading to clinical remission in most patients after a single cycle. Only 12.9% of patients experienced relapses after a median follow-up of 25 months.

Regarding biomarkers, anti-CNTN1 antibody titers correlated with clinical severity at sampling and became undetectable after effective treatment in all but one patient. sNfL levels were significantly higher, and sCNTN1 levels significantly lower, in anti-CNTN1 patients compared to healthy controls. Both biomarkers normalized following successful therapy.

Conclusion: Patients with anti-CNTN1+ AN have a characteristic clinical profile and rituximab is the most effective treatment. Anti-CNTN1 antibodies, sNfL and sCNTN1 are useful to monitor disease status in these patients

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL NERVIOS PERIFÉRICO

Los nervios periféricos forman parte del sistema nervioso periférico (SNP), junto con otras estructuras como los ganglios raquídeos dorsales, las raíces nerviosas y las terminaciones especializadas. Su objetivo es la transmisión de información entre el sistema nervioso central (SNC) y los órganos y tejidos. Los nervios periféricos se pueden clasificar en eferentes (motores), aferentes (sensitivos) y mixtos.

1.1.1. Anatomía del nervio periférico y tipos de fibras nerviosas

Los nervios periféricos están formados por diferentes fibras nerviosas que consisten en grupos de axones rodeados de células de Schwann (CS). Las diferentes fibras nerviosas están separadas por tejido conectivo formando el **endoneuro**, y estas fibras se agrupan en fascículos. Cada fascículo está rodeado de una capa de tejido conectivo llamado **perineuro**, y un grupo de fascículos forma un tronco nervioso que está protegido de los tejidos circundantes por el **epineuro** (figura 1) (1).

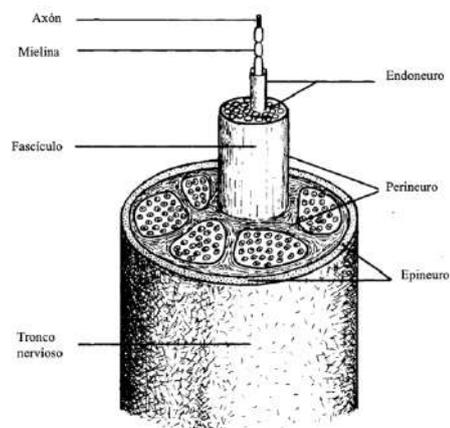


Figura 1. Estructura macroscópica del nervio periférico. (Adaptada de Wikinson, 1992) (1)

Los axones son las prolongaciones neuronales que transmiten estímulos eléctricos y están principalmente formados por neurofilamentos, mitocondrias, microtúbulos y vesículas de transporte. Las CS son las células de soporte del SNP, cuya función es dar aporte metabólico y protección a los axones. Existen varios tipos de CS, las amielínicas, que darán soporte a axones más pequeños y formarán las **fibras no mielinizadas**; y CS productoras de mielina, que dan soporte a axones de mayor diámetro y formarán las **fibras**

mielinizadas. Además, dentro de las fibras mielínicas y amielínicas, existirán diferentes tipos de fibras nerviosas en función de su estructura y su función (tabla 1) (2).

Tabla 1. Tipos de fibras nerviosas según Erlanger y Gasser. (Adaptada de Marani et al, 2012) (2).

Mielina	Tipo de fibra	Función	Diámetro (μm)	Velocidad de conducción (m/s)
Sí	A α	Propiocepción (huso muscular, órgano tendinoso de Golgi) Motora eferente (somático)	12-20	70-120
	A β	Tacto y presión	5-12	30-70
	A γ	Motora (husos musculares)	3-6	15-30
	A δ	Tacto, dolor (rápido), temperatura	2-5	12-30
	B	Preganglionar autonómico	<3	3-15
No	C	Dolor (lento), temperatura, postganglionar autonómico	0.3-1.3	0,5-2

1.1.2. Estructura de las fibras mielinizadas

En las fibras nerviosas mielinizadas, cada CS proporciona mielina a un solo axón (a diferencia de las no mielinizadas en que una CS da soporte a más de un axón). La mielina compacta es un conjunto de modificaciones de la membrana plasmática de la CS y las proteínas más importantes son: las glicoproteínas P0, P1, P2, la proteína de la mielina periférica 22 (PMP22) y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (2).

Un única CS envuelve una longitud variable de axón (de 20 a 2000 μm), y cada vaina de mielina compacta con su segmento de axón se llama **internodo**. Entre internodos, existe un segmento de axón desprovisto de mielina, llamado **nodo de Ranvier** (3) (figura 2). La función del nodo de Ranvier es asegurar la conducción nerviosa saltatoria, siendo ésta más eficaz y rápida que en las fibras no mielinizadas. Las estructuras adyacentes al nodo de Ranvier son el paranodo y, más externamente, el yuxtaparanodo, cada una de ellas con sus estructuras características (figura 2 y 3) (4).

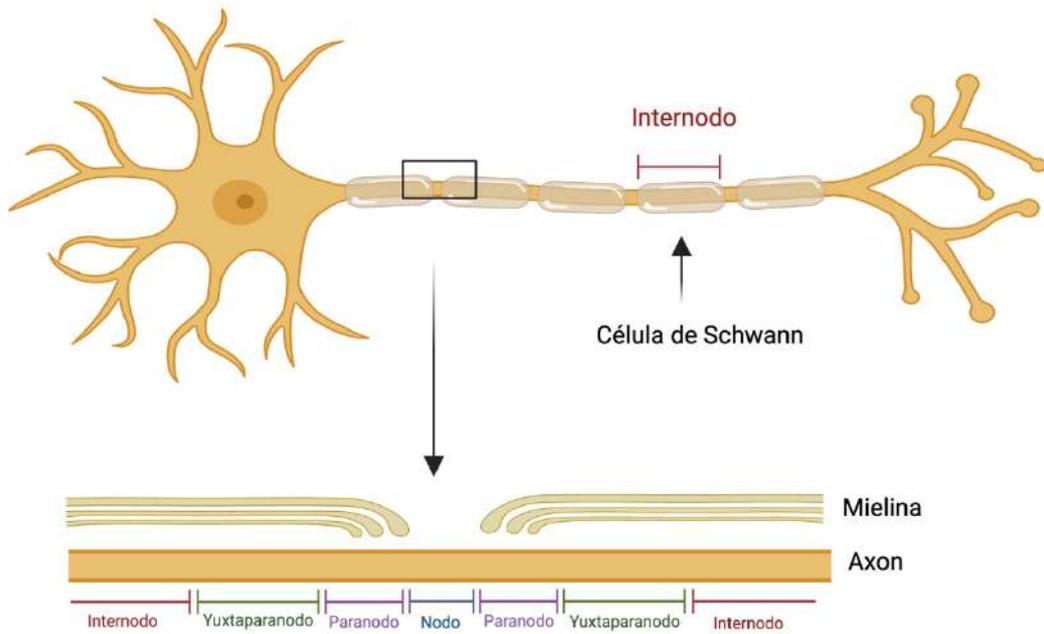


Figura 2. Estructura de las fibras nerviosas mielinizadas. (Figura creada con BioRender).

El **nodo** es la estructura del axón desprovista de vaina de mielina. El principal componente del nodo son los canales de sodio voltaje dependientes, predominantemente la subunidad alfa Nav1.6, responsables de la propagación del potencial de acción. Además, para evitar las descargas repetitivas, también están presentes los canales de potasio voltaje dependientes (Kv7.2/7.3), que frenan la propagación del potencial de acción. Estos canales voltaje dependientes están anclados al axón mediante la proteína de anclaje ankirina G, y ésta está unida a la proteína β IV espectrina (2,3). Por otra parte, en el nodo también se encuentran moléculas de adhesión celular (CAMs) cuyo objetivo es estabilizar la unión entre el axolema y las CS, como la gliomedina secretada por las microvellosidades de las CS en la matriz extracelular que se une al a neurofascina-186 (NF186) y a la molécula de adhesión celular neuronal (NrCAM) en el axolema (5).

El **paranodo** es la estructura adyacente al nodo que está principalmente formado por las uniones axo-gliales. Estas uniones axo-gliales son estructuras únicas, llamadas bandas transversas que se constituyen como septos formados por la isoforma 155 de la neurofascina (NF155) en los bucles de mielina, y heterodímeros de contactin-1 (CNTN1) y proteína asociada a contactin-1 (Caspr1) en el axolema (6,7). La función de las bandas transversas es asegurar la propagación saltatoria del potencial de acción mediante el

aislamiento del nodo (rico en canales de sodio) del yuxtaparanodo (rico en canales de potasio).

La zona contigua al paranodo es el **yuxtaparanodo**, que principalmente está formado por canales de potasio voltaje dependientes (Kv1.1/1.2) y que participan en la fase de repolarización de los potenciales de acción. Además, en el yuxtaparanodo se encuentra la proteína contactin-2 (CNTN2) y la proteína asociada a contactin-2 (Caspr2) en el axolema, que se unen a CNTN2 glial expresada en la CS, formando una unión axo-glial (6,8). Finalmente, en el segmento internodal, la parte más extensa de las fibras nerviosas mielinizadas, se encuentra el axón rodeado de la mielina compacta. En el internodo se expresan CAMs que estabilizan la unión axo-glial como la proteína MAG, y las nectin-like CAMs (Nec1, Nec2 y Nec4) (6).

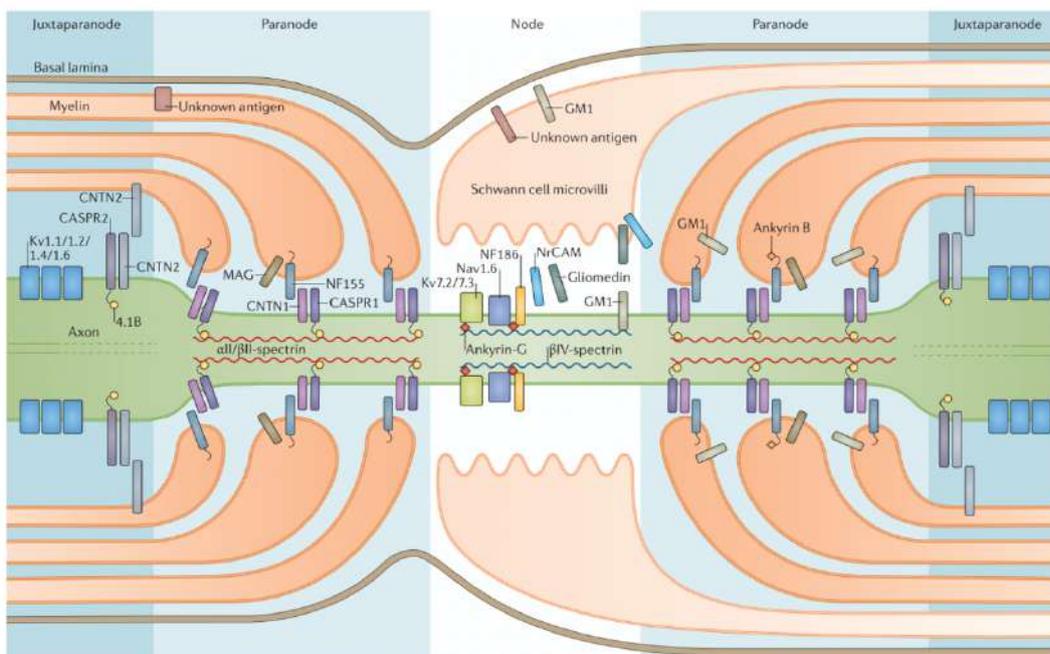


Figura 3. Estructura del nodo de Ranvier. (Adaptada de Querol et al, 2017) (4).

1.2. INMUNOLOGÍA DEL NERVI PERIFÉRICO

El sistema nervioso periférico está sometido a un gran control inmunológico para proteger su función y evitar lesiones que puedan alterarlo. Los principales efectores de este control inmunológico son la barrera hemato-nerviosa (BHN) y diferentes subtipos celulares como las células T y B activadas y las células presentadoras de antígeno (principalmente macrófagos) (9). Las CS también tienen su papel en este control inmunológico, pudiendo actuar como células presentadoras de antígeno. Sin embargo, cuando estos mecanismos

de regulación inmunológica no funcionan correctamente, puede aparecer patología en forma de neuropatías inmunomediadas, como el síndrome de Guillain-Barré (SGB) o la poliradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante crónica (CIDP) (10).

La **barrera hemato-nerviosa** está localizada en la capa más profunda del perineuro y los vasos endoneurales (10), y está formada por células endoteliales (adheridas entre ellas por uniones estrechas), pericitos y una membrana basal (11) (figura 4). Mantiene la integridad del SNP y evita el paso de diferentes componentes celulares y moléculas nocivas que circulen por la sangre. Aun así, existen zonas del SNP desprovistas de BHN (ganglios raquídeos dorsales, raíces nerviosas y unión neuromuscular), por lo que son más susceptibles a lesión cuando hay un ataque externo (10). La rotura de la BHN es una de las primeras alteraciones que se encuentran en los modelos animales de neuropatías inflamatorias (12,13).

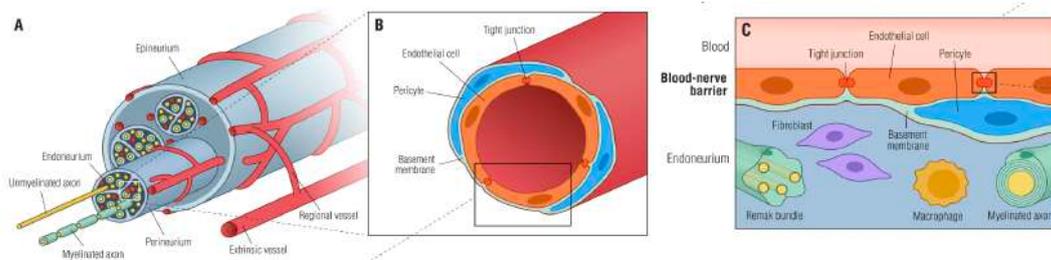


Figura 4. Estructura de la barrera hemato-nerviosa (*Adaptada de Richner et al, 2019*) (11).

Figura 4A: visión transversal de un nervio periférico. Figura 4B: vaso endoneural rodeado de células endoteliales, pericitos y membrana basal. Figura 4C: estructura de la barrera hemato-nerviosa que protege los diferentes componentes del endoneuro.

1.2.1. Inmunidad celular

La inmunidad celular es de vital importancia en la fisiopatología de las neuropatías inmunomediadas. Los linfocitos T se activan tras la presentación de antígenos peptídicos por células presentadoras de antígenos, como los macrófagos y las CS (15). El antígeno se presenta mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I a los linfocitos T citotóxicos CD8+, o mediante el MHC clase II a los linfocitos T CD4+. El MHC-I está presente en la mayoría de las células humanas, mientras que el MHC-II solo se expresa en células presentadoras de antígeno como los linfocitos B, los macrófagos o las células dendríticas. En biopsias de pacientes con SGB y CIDP se ha encontrado un aumento de la expresión de MHC clase II en las CS, lo que apoya su papel como células presentadoras de antígeno (16–18).

Una vez los linfocitos están activados, secretan metaloproteasas y moléculas de adhesión que contribuyen al daño de la BHN y al paso de estas células T al tejido nervioso (19,20). Dentro del tejido nervioso, los linfocitos T secretan citocinas proinflamatorias (como IL2, $IFN\gamma$ o $TNF\alpha$) (21), que contribuyen a su expansión clonal y a la propagación de la respuesta inmune con el reclutamiento de otras células inflamatorias como los macrófagos (con actividad fagocítica y citotóxica).

1.2.2. Inmunidad humoral: los anticuerpos

La activación de células B y la producción de anticuerpos contra glicoproteínas y glicolípidos es uno de los mecanismos fisiopatológicos conocidos más relevantes en las neuropatías inflamatorias (4). Los anticuerpos actúan destruyendo el tejido nervioso mediante la unión a macrófagos y activando la respuesta citotóxica; y mediante la unión directa al tejido y la activación de complemento (22) (figura 5).

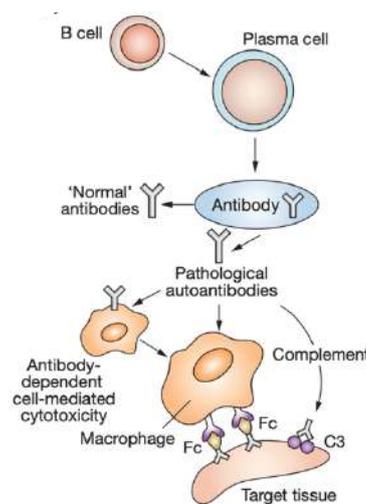


Figura 5. Mecanismos de daño tisular de anticuerpos patogénicos. (Adaptado de Dalakas et al, 2008)

El ejemplo más importante de neuropatía inflamatoria mediada por anticuerpos es el SGB, enfermedad postinfecciosa en el que se conoce que existe una reactividad cruzada entre antígenos de patógenos como *Campylobacter* con gangliósidos presentes en el nervio periférico como GM1 (23). Además, se han descrito anticuerpos contra glucolípidos también en CIDP, en un gran número de pacientes con neuropatía motora multifocal (NMM) y en las neuropatías atáxicas crónicas (4,24–26). Finalmente, anticuerpos IgM contra la glucoproteína asociada a la mielina (MAG) están presentes en la mitad de los pacientes con gammopatía monoclonal IgM (26).

1.2.2.1 Generalidades de los anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por las células plasmáticas como parte de la respuesta inmunológica humoral (27). Éstos representan la versión soluble y afinada del receptor de las células B, y su función principal es la de neutralizar y combatir agentes externos nocivos para el organismo. Los anticuerpos tienen una estructura común (28). Están compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (o cadenas H,) y dos cadenas ligeras (o cadenas L,), unidas por puentes disulfuros. Cada cadena ligera posee una región variable (VL) y una región constante (VC), mientras que las cadenas pesadas poseen una región variable (VH) y tres regiones constantes (CH1, CH2, CH3). A su vez, los anticuerpos tienen una región de unión a antígeno (Fab, del inglés *antigen binding fragment*) y una región que posee la propiedad de ser fácilmente cristalizable (Fc, del inglés *crystalline fragment*). La región Fab es la responsable del reconocimiento y especificidad antigénica de los anticuerpos y la región Fc es la que interactúa con los receptores celulares y el sistema de complemento, formada por las cadenas CH2 y CH3. La figura 6 resume la estructura de los anticuerpos.

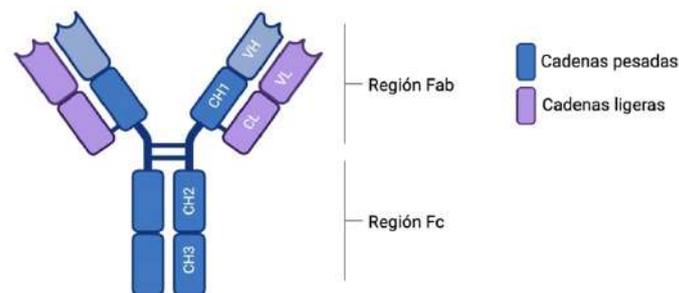


Figura 6. Estructura de un anticuerpo. Un anticuerpo está formado por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Cada cadena ligera está formada por una región constante (CL) y una región variable (VL); y cada cadena pesada por una región variable (VH) y tres constantes (CH1, CH2, CH3). La región Fab es la región de unión a antígeno. (Figura creada con BioRender).

Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco isotipos principales IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, cada uno con funciones específicas y distribuciones distintas en el organismo. Las IgGs son el isotipo más abundante, que a su vez se dividen en cuatro subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Las IgG4 tienen características únicas, siendo anticuerpos con mucha afinidad

antigénica con capacidad de patogenicidad por el bloqueo directo proteína-proteína (29). Además, a diferencia de otras subclases como la IgG3, no son capaces de activar complemento o respuesta celular, que son directamente moduladas por terapias convencionales con las inmunoglobulinas endovenosas (IgEV), motivo por el cual, las enfermedades mediadas por IgG4 tienen una respuesta pobre a dichos tratamientos. Finalmente, los anticuerpos IgG4 presentan una valencia funcional variante. Estos anticuerpos tienen la capacidad de intercambiar uno de sus brazos Fab con otras IgG4 no relacionadas, lo que los convierte en anticuerpos monovalentes y biespecíficos (30). Dicha capacidad les confiere, en la mayoría de los casos, más patogenicidad, aunque existen diferencias entre los diferentes tipos de IgG4 (31).

1.2.2.2. Técnicas de detección de nuevos autoanticuerpos

La detección de nuevos autoanticuerpos ha sido el principal objetivo de muchos grupos de investigación dedicados a las enfermedades autoinmunes. La identificación de autoanticuerpos es fundamental para el diagnóstico, clasificación y manejo de estas enfermedades. A lo largo de los años, se han utilizado diversas tecnologías y enfoques experimentales para la detección y caracterización de autoanticuerpos (32). A continuación, se describen métodos de detección de autoanticuerpos más utilizados en la actualidad, así como nuevas técnicas recientemente descritas y con potencial utilidad en este campo.

1.2.2.2.1. Técnica del antígeno candidato

En el contexto de la búsqueda de nuevos autoanticuerpos, la técnica del antígeno candidato consiste en evaluar de manera dirigida la presencia de anticuerpos contra diferentes proteínas o moléculas específicas, que, por razones biológicas o clínicas se sospecha que puedan ser dianas relevantes.

El antígeno se produce habitualmente en forma recombinante bien para realizar extractos proteicos purificados, que luego se utilizan en ensayos basados en proteína, como ELISA o Western Blot (WB); o bien mediante su expresión en células transfectadas con el antígeno relevante para luego realizar inmunocitoquímica con el suero/LCR del paciente y evaluar su reactividad (33,34).

1.2.2.2.2. Inmunoprecipitación clásica

Una de las estrategias más comúnmente usadas y que ha servido para la detección de nuevos anticuerpos en enfermedades diversas, es la inmunoprecipitación (IP) de tejido o células, seguida de la identificación del antígeno mediante espectrometría de masas.

Para poder llevar a cabo esta técnica, lo primero que se debe hacer es identificar un patrón de reactividad de fluido del paciente (suero/plasma/LCR) en tejido o células en cultivo. El tejido/células se lisan para liberar las proteínas en solución y para obtener el complejo antígeno-anticuerpo libre. Posteriormente, se incuba el lisado con microesferas (por ejemplo, magnéticas o de agarosa), que capturan el complejo antígeno-anticuerpo y lo precipitan (bien mediante centrifugación, gracias a la masa de las microesferas de agarosa; o bien mediante captura magnética en el caso de las microesferas magnéticas). Se eliminan las proteínas no específicas mediante lavados sucesivos del precipitado y se consigue aislar el complejo antígeno-anticuerpo para proceder a su identificación mediante espectrometría de masas. La Figura 7 resume la técnica de IP como mecanismo de detección de nuevos autoanticuerpos. Este método es el que se usó para la identificación del anticuerpo anti-contactin-1 (CNTN1) o de anti-neurofascin (NF) (35,36).

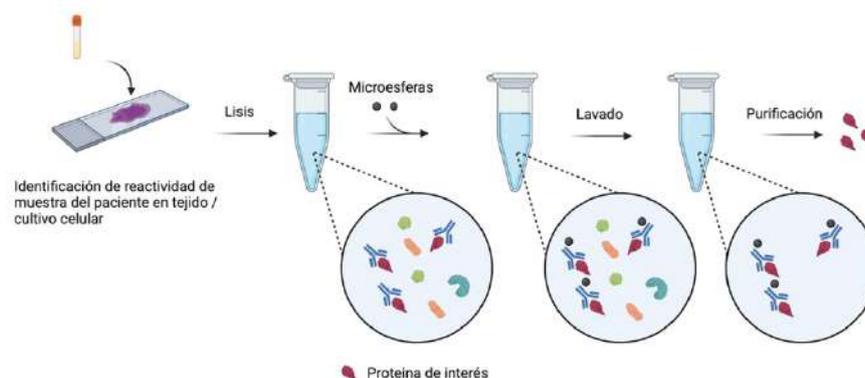


Figura 7. Inmunoprecipitación clásica. Tras la identificación de un patrón de reactividad en tejido o células se procede a la lisis de éstos para la liberación del complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente, mediante la incubación con microesferas se precipita el complejo y se lava para eliminar proteínas inespecíficas y se extrae el antígeno candidato. (*Figura creada con BioRender*).

1.2.2.2.3. Inmunoprecipitación con fagos

La secuenciación de inmunoprecipitación con fagos (PhIP-seq) es una técnica molecular innovadora diseñada para el descubrimiento de nuevos autoantígenos. Esta metodología usa una biblioteca de bacteriófagos T7 que exhiben una amplia gama de péptidos derivados del proteoma humano (pudiendo ser, incluso, el proteoma humano completo), permitiendo una exploración exhaustiva de las dianas de autoanticuerpos (37).

Para llevar a cabo esta técnica, inicialmente se construyen bibliotecas de secuencias nucleotídicas que codifican para péptidos consecutivos que cubren todas las secuencias de las proteínas de interés. Estas secuencias se insertan en el genoma de fagos T7 (virus bacteriófagos), que expresan los péptidos codificados en su superficie como fusiones con proteínas de la cápside. Posteriormente, los fagos se incuban con muestras del paciente (suero, LCR...) en las que se encuentran los autoanticuerpos de interés, permitiendo que estos se unan a los péptidos que reconocen. Los complejos fago-anticuerpo se capturan mediante inmunoprecipitación usando microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpos secundarios que reconocen inmunoglobulinas humanas. Finalmente, el ADN de los fagos capturados se amplifica mediante PCR, con posterior secuenciación de éste. La figura 8 resume los fundamentos técnicos de esta técnica.

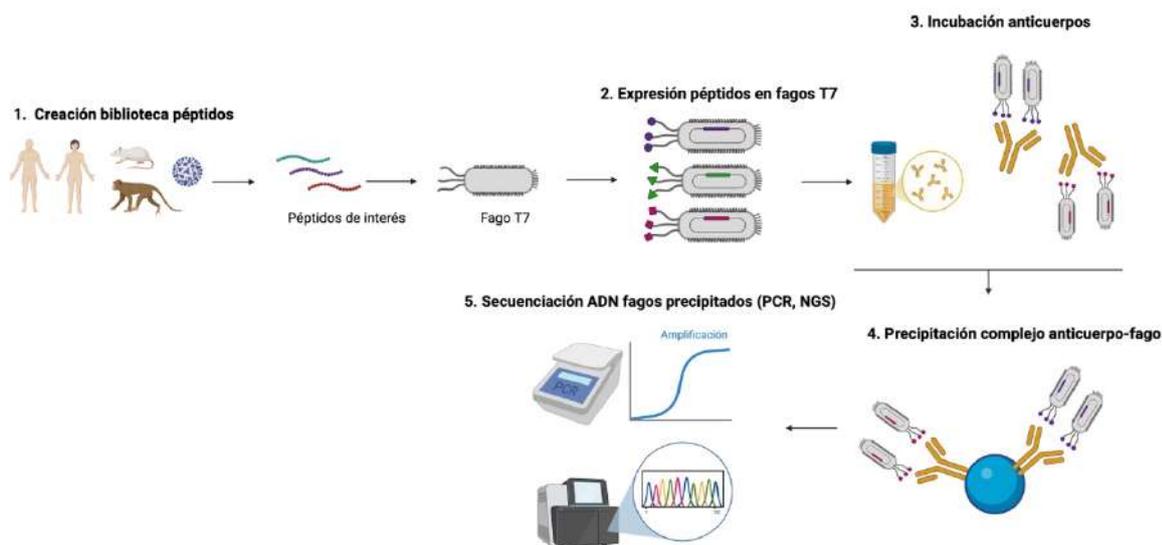


Figura 8. Inmunoprecipitación con fagos. Primero, se crea la biblioteca de péptidos de interés (1) que se expresarán en fagos T7 (2). Estos fagos se incuban con anticuerpos del paciente, permitiendo que estos se unan al fago que reconocen (3). Posteriormente, se precipita el complejo anticuerpo-fago (4) y se identifica el antígeno mediante la amplificación del DNA del fago por PCR y su secuenciación. PCR: reacción en cadena de la polimerasa; NGS: secuenciación de nueva generación. (Figura creada con BioRender).

En neurología, la PhIP-seq se ha utilizado en múltiples trabajos, algunos de ellos centrados en el estudio serológico de patología infecciosa con el VirScan (que expresa péptidos provenientes de miles de proteínas virales) (41). Además, la librería del proteoma humano ha contribuido en el descubrimiento de los anticuerpos anti-ZSCAN1 en pacientes con encefalitis pediátrica (42) y los anti-Cavin 4 en la enfermedad de *rippling* adquirida (43).

1.2.2.2.4. Microarrays de proteínas

Los microarrays de proteínas son plataformas que inmovilizan miles de proteínas en una superficie sólida, para después incubarlos con muestras biológicas con el objetivo de detectar interacciones (44). Existen diferentes tipos de microarrays. Por un lado, las proteínas inmovilizadas pueden tratarse de aptámeros o anticuerpos para la cuantificación de moléculas específicas tales como las citocinas. Por otra parte, se pueden inmovilizar proteínas recombinantes o péptidos con tal de estudiar la presencia de autoanticuerpos en las muestras biológicas (figura 9).

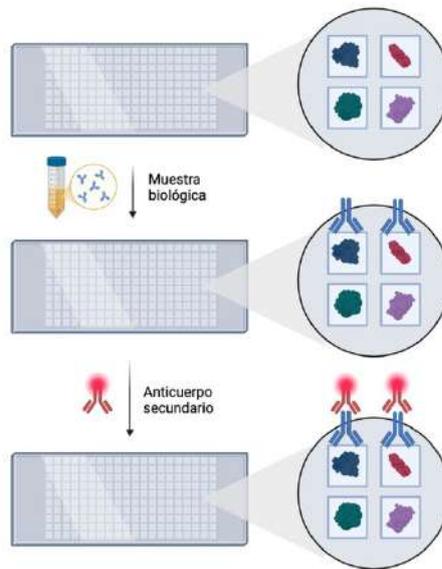


Figura 9. Microarrays de proteínas cuyo objetivo es la detección de autoanticuerpos en muestras biológicas.

Este tipo de técnica se ha usado en múltiples enfermedades autoinmunes para la detección de autoanticuerpos (45–47). En el campo de las neuropatías autoinmunes, un estudio reciente realizó un cribaje de sueros de pacientes con CIDP en un microarray de proteínas (con expresión de 16000 proteínas) con el objetivo de encontrar nuevos antígenos (48). En este estudio se detectaron más de 700 antígenos específicos de CIDP (con especial representación de proteínas de uniones de anclaje). Además, detectaron un subgrupo de pacientes con características clínicas similares y perfil autoantigénico específico. Sin embargo, no se logró encontrar un antígeno común en todas las CIDPs.

Los microarrays de proteínas tienen múltiples limitaciones. Una de las más importantes es que no detectan epítomos conformacionales que dependen de la estructura tridimensional

de las proteínas. Además, al ser proteínas generalmente expresadas en sistemas no mamíferos (levaduras, bacterias...) no incorporan las modificaciones postraduccionales humanas, lo que también modifica las probabilidades de detección de autoanticuerpos clínicamente relevantes. Por otra parte, requieren de validación adicional de los hallazgos con técnicas convencionales, tales como el ELISA o los CBA.

De cara a solventar algunas de estas limitaciones, recientemente han aparecido los microarrays de proteínas expresadas en células humanas (49). Estos microarrays consisten en la expresión de las proteínas en estructuras celulares humanas (como las HEK293), mediante la transfección de ADN en estas células. Permiten analizar proteínas en su conformación nativa y con modificaciones postraduccionales, lo que hace que tengan mayor sensibilidad y especificidad que los arrays de proteínas convencionales, logrando una baja tasa de falsos positivos y negativos. Desde que apareció la tecnología, se ha utilizado predominantemente en investigación médica y desarrollo de fármacos, como el descubrimiento de dianas de la respuesta inmunitaria en la leucemia linfocítica crónica o la búsqueda de dianas secundarias de fármacos terapéuticos concretos (50,51). Hasta la fecha, no se ha evaluado la efectividad de estos microrrays celulares para el descubrimiento de nuevos autoanticuerpos en muestras biológicas como el suero o el plasma de los pacientes.

1.3. NEUROPATÍAS AUTOINMUNES

Las neuropatías autoinmunes son un grupo heterogéneo de enfermedades inmunomediadas que se caracterizan por una respuesta inmune contra antígenos del SNP. Existen formas agudas, englobadas en el SGB y sus variantes; y formas crónicas, como la CIDP, la NMM, la polineuropatía asociada a gammapatía monoclonal IgM (MGUS-P) y las neuropatías atáxicas crónicas (15). Además, recientemente ha aparecido una nueva categoría diagnóstica, las nodopatías autoinmunes (NoA), donde se engloban las neuropatías autoinmunes con anticuerpos contra proteínas del nodo y el paranodo de Ranvier y que se pueden presentar de una forma aguda, subaguda o crónica (tabla 2).

Tabla 2. Neuropatías autoinmunes. <i>Adaptada de Kieseier et al, 2018 (15).</i>		
Agudas	Síndrome de Guillain Barré (SGB)	<ul style="list-style-type: none"> - Polineuropatía aguda inflamatoria desmielinizante (AIDP). - Neuropatía axonal motora aguda (AMAN). - Neuropatía axonal sensitivo-motora aguda (AMSAN). - SGB sensitivo puro. - Variantes loco-regionales: faringo-cérvico-braquial, paraparética, debilidad facial bilateral con parestesias. - Espectro Miller-Fisher: síndrome Miller-Fisher típico, encefalitis de Bickerstaff.
	Nodopatías autoinmunes (NoA)	<ul style="list-style-type: none"> - NoA con anticuerpos anti-neurofascin 155. - NoA con anticuerpos anti-contactin-1. - NoA con anticuerpos anti-caspr-1 (proteína asociada a contactin-1). - NoA con anticuerpos pan-neurofascin
Crónicas	CIDP	Ver tabla 3.
	Neuropatía motora multifocal (NMM)	<ul style="list-style-type: none"> - NMM. - NMM sin bloqueos de la conducción.
	Polineuropatía asociada a gammapatía monoclonal de significado incierto IgM (MGUS-P)	<ul style="list-style-type: none"> - MGUS-P con anticuerpos contra la glicoproteína asociada a la mielina (MAG). - MGUS-P sin anticuerpos anti-MAG.
	Neuropatías atáxicas crónicas	<ul style="list-style-type: none"> - Neuropatía atáxica crónica, oftalmoplejía, paraproteinemia IgM, aglutininas frías, y anticuerpos anti-disialosil (CANOMAD). - Neuropatía atáxica crónica con anticuerpos anti-disialosil (CANDA).

1.3.1. Polirradiculoneuropatía inflamatoria desmielinizante crónica (CIDP)

1.3.1.1. Características clínicas de la CIDP y sus variantes

La CIDP es la neuropatía autoinmune crónica más frecuente, con una prevalencia de entre 0,67-10,3 casos por 100.000 habitantes (53). La CIDP es más frecuente en hombres, y la edad media de presentación está en torno a 50 años (54). La CIDP típica se caracteriza por un déficit sensitivo-motor de las cuatro extremidades con un curso progresivo o remitente-

recurrente e instauración durante al menos 8 semanas (55). Sin embargo, hasta un 16% de los pacientes puede presentarse de forma aguda (llamada CIDP aguda), con una evolución rápida en 4 semanas (56). Además, se ha descrito que un 5% de los pacientes diagnosticados de SGB, son finalmente diagnosticados de CIDP (57).

Existe una gran variedad fenotípica en los pacientes con CIDP, siendo la **CIDP típica** la más frecuente. Aquellos que se presentan de una forma diferente a la CIDP típica, se engloban dentro del concepto de variantes de CIDP, resumidas en la tabla 3. Cada una de ellas tiene sus características clínicas, aunque comparten rasgos comunes como la desmielinización o la respuesta a inmunoterapia. No está claro si sus mecanismos patogénicos son comunes, y se ha descrito que hay un porcentaje de pacientes diagnosticados de variantes de CIDP que evolucionan con el tiempo a una CIDP típica (58).

La **CIDP distal**, también llamada neuropatía desmielinizante adquirida distal simétrica (DADS), se caracteriza por un déficit motor y sensitivo distal, asociado a inestabilidad de la marcha (59). La debilidad es más frecuente en miembros inferiores. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con este fenotipo tienen una MGUS-IgM, la mayoría de ellos con anticuerpos contra la glicoproteína asociada a la mielina (MAG). Los pacientes con fenotipo CIDP distal y anticuerpos anti-MAG están considerados como otra categoría diagnóstica que difiere de la CIDP ya que las implicaciones diagnósticas y terapéuticas son diferentes (60).

Otras variantes de CIDP menos frecuentes son la CIDP multifocal (también llamada síndrome de Lewis-Sumner o neuropatía desmielinizante adquirida sensitivo-motora multifocal [MADSAM]) (61), la CIDP focal (62), la CIDP motora pura (o predominantemente motora) (63) y la CIDP sensitiva pura (o predominantemente sensitiva) (64).

Tabla 3. Variantes fenotípicas de CIDP. *Adaptado de Mathey et al, 2015 (64) y Van den Berg et al, 2021 (65).*

Variante fenotípica	Prevalencia	Presentación clínica	Distribución
CIDP típica	50-75%	Sensitivo-motora	Simétrica, proximal y distal
CIDP distal	2-17%	Sensitivo > motora	Simétrica, distal Predominante en extremidades inferiores
CIDP multifocal	6-15%	Sensitivo-motora	Asimétrica Predominante en extremidades superiores
CIDP focal	1%	Sensitivo-motora	Afectación 1 extremidad
CIDP motora pura	4-10%	Motor (predominantemente)	Simétrica, proximal y distal
CIDP sensitiva pura	4-35%	Sensitivo (predominantemente)	Simétrica, proximal y distal

1.3.1.2. Diagnóstico de la CIDP

El diagnóstico de CIDP es complejo y se basa en criterios clínicos, electrofisiológicos y de soporte. Los criterios diagnósticos más utilizados actualmente son los propuestos por el consenso de expertos de la European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society (EFNS/PNS). Estos se publicaron por primera vez en 2005 (66), con una revisión posterior en 2010 (67) y otra reciente (de la European Academy of Neurology y la Peripheral Nerve Society) en 2021 (65). Los últimos criterios diagnósticos dividen a los pacientes en dos categorías diagnósticas: CIDP y CIDP posible, requiriendo de criterios clínicos y neurofisiológicos para su diagnóstico. Además, se exponen unos criterios de apoyo (respuesta objetiva a tratamiento, pruebas de imagen compatibles, hiperproteinorraquia en LCR y hallazgos de desmielinización en biopsia de nervio) que se pueden utilizar en pacientes que solo llegan a cumplir criterios de CIDP posible, para acceder al diagnóstico definitivo de CIDP. A pesar de ello, la CIDP sigue siendo una enfermedad con un alta tasa de errores de diagnóstico (68), por lo que se requiere de un abordaje sistemático y de un alto nivel de experiencia para su correcta evaluación.

1.3.1.3. Anticuerpos en CIDP

La inmunidad humoral es un mecanismo fisiopatológico clave en la CIDP. La respuesta de estos pacientes a IgEV o a recambio plasmático sugiere que la presencia de autoanticuerpos está implicada en su patogénesis (69). Además, se ha descrito que la transferencia pasiva de suero o IgG purificada de pacientes con CIDP (70) produce desmielinización *in vivo*.

La búsqueda de autoanticuerpos en pacientes con CIDP ha sido uno de los principales temas de investigación en el campo de las neuropatías autoinmunes. Los primeros estudios se centraron, siguiendo la aproximación de “antígeno candidato”, en la descripción de anticuerpos contra proteínas de la mielina compactada como proteína de mielina cero (MPZ) (71), la conexina-31 (72), la proteína de mielina periférica 2 (PMP2) (73) y PMP22 (74). Sin embargo, su papel clínico y patogénico en la CIDP no ha sido demostrado y la mayoría de ellos no han sido replicados.

En un estudio reciente se realizó un cribaje sistemático de anticuerpos IgG e IgM contra tejido nervioso periférico (motoneuronas, neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y células de Schwann) en una gran cohorte de pacientes con CIDP (n=57) (75). Un número significativo de pacientes (38,6%) mostró reactividad frente a cualquiera de los tres componentes celulares (figura 10), lo que aporta pruebas experimentales de la diversidad inmunopatológica de estos pacientes. No obstante, en este estudio no se logró encontrar un antígeno específico.

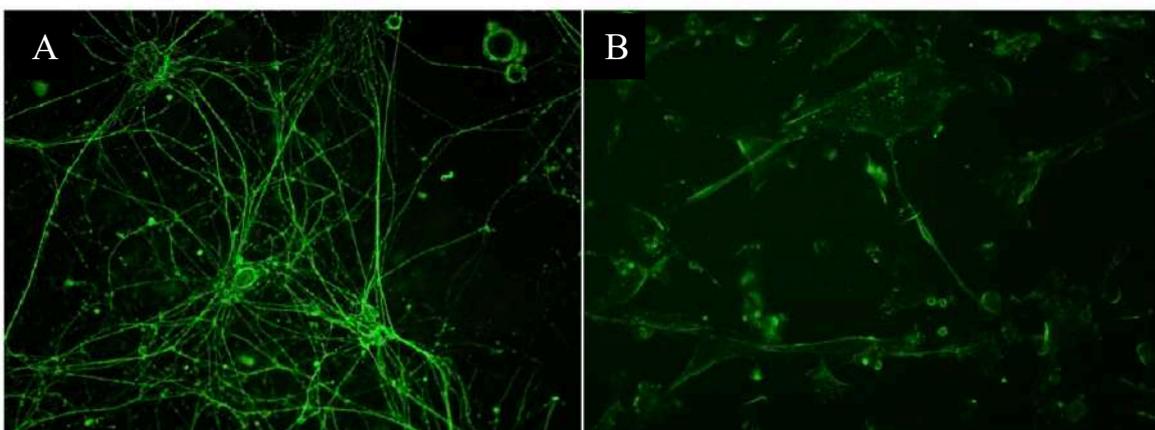


Figura 10. Ejemplos de reactividad IgG de CIDPs contra diferentes líneas celulares. Figura 5A: reactividad IgG contra células de ganglio raquídeo dorsal. Figura 5B: reactividad IgG contra células de Schwann. (*Adaptada de Querol et al 2017*) (75)

Finalmente, en el último año se ha descrito un potencial nuevo antígeno en una cohorte de pacientes con CIDP, la proteína dihidrolipamida S-acetiltransferasa (**DLAT**) (76), pero estos hallazgos no han sido replicados (77).

1.3.1.4. Tratamiento de la CIDP

El tratamiento de la CIDP es complejo y se debe adaptar a cada paciente. Los tratamientos actuales de primera línea son las inmunoglobulinas endovenosas o subcutáneas (IgEV o IgSC), los corticosteroides y el recambio plasmático. Todas ellas se pueden usar como terapia de inducción (excepto las IgSC) o como tratamiento de mantenimiento (78). Sin embargo, no todos los pacientes responden a tratamientos de primera línea, con un 10-25% de pacientes que presentan una CIDP refractaria (79).

En los últimos años, los esfuerzos se han centrado en evaluar la eficacia de nuevas terapias que tratan de abordar la fisiopatología de esta enfermedad (80). Tres nuevas estrategias se han evaluado como posibles abordajes para el tratamiento de la CIDP: depleción de células B, reducción de IgG e inhibición del complemento (figura 11).

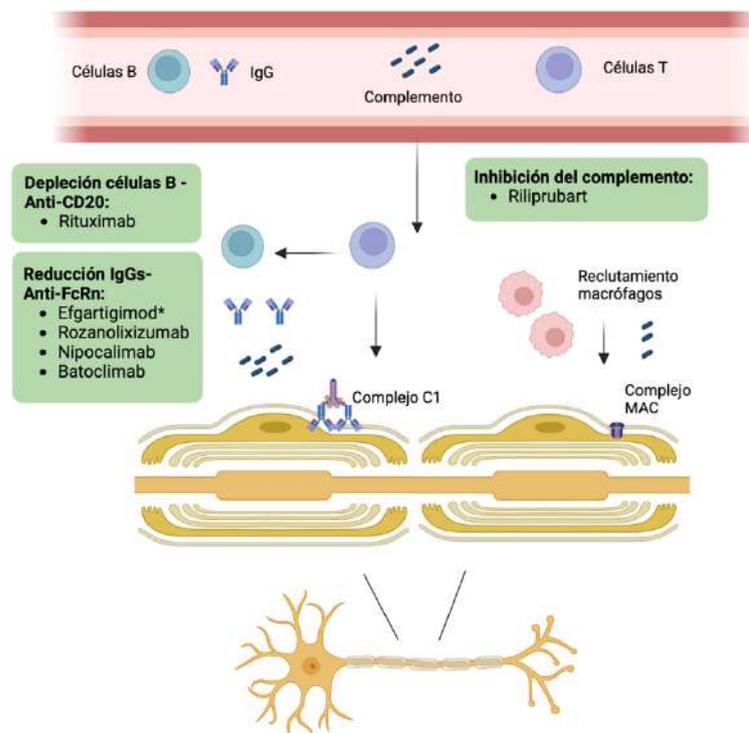


Figura 11. Nuevas estrategias para el tratamiento de la CIDP. *Efgartigimod es el único tratamiento actualmente aprobado para el tratamiento de la CIDP por la Food and Drug Administration (FDA). El resto están siendo ensayados. (Figura creada con BioRender).

Respecto a la depleción de células B, se ha planteado que el **rituximab** (fármaco anti-CD20), puede ser útil en la CIDP, como en otras enfermedades autoinmunes (81), con resultados no concluyentes en los estudios realizados. (82,83), (84).

Por otra parte, se ha planteado la inhibición del receptor neonatal del fragmento fc de las inmunoglobulinas (FcRn) como potencial diana terapéutica. Esto ha demostrado ser eficaz en trastornos mediados por anticuerpos, como la miastenia gravis (86). Efgartigimod (anticuerpo IgG1 humano anti-FcRN) ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la CIDP respecto a placebo, motivo por el cual, ha sido recientemente aprobado para pacientes con CIDP por la Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) (88). Otros anti-FcRn testados en la CIDP son el rozanolixizumab (ensayo con resultados negativos) nipocalimab y batoclimab (ambos con ensayos en marcha) (80).

Finalmente, teniendo en cuenta que la activación del **complemento** es un factor clave en los mecanismos fisiopatológicos de la CIDP (89), en la actualidad se está también investigando la utilidad de los fármacos que inhiben complemento, con resultados prometedores (90).

1.3.2. Nodopatías autoinmunes

Las NoA son una categoría diagnóstica recientemente reconocida según los últimos criterios diagnósticos de CIDP (EAN/PNS 2021) (65) . Se trata de una entidad muy poco frecuente, que corresponde a un 5-10% de los pacientes que cumplen criterios clínicos y electrofisiológicos de CIDP pero en los que se identifican anticuerpos dirigidos contra moléculas de adhesión del nodo de Ranvier (91). Hasta la fecha, se han descrito anticuerpos contra la neurofascina 155 (NF155) (92), contactin-1 (CNTN1) (35), proteína asociada a contactin-1 (Caspr1) (93) y neurofascin 140/186 (NF140/186) o pan-neurofascina (pan-NF) (36). A pesar de ser infrecuente, es importante identificar esta entidad de forma precoz ya que requiere de un abordaje terapéutico diferente.

1.3.2.1. Características clínicas de las nodopatías autoinmunes

Todas las NoA tienen características comunes y otras específicas de cada subtipo de anticuerpo. El espectro clínico de las NoA incluye formas de inicio agudo que se pueden confundir con el SGB, así como formas crónicas más similares a la CIDP, con curso remitente-recurrente o progresivo. Sin embargo, las NoA presentan características clínicas diferenciales del SGB y la CIDP, que deben hacer sospecharlas. Los pacientes con NoA suelen presentar mala respuesta a tratamientos convencionales como las IgEV (91,94,95).

Además, típicamente tienen hiperproteínorraquia marcada en LCR y engrosamiento o realce de raíces nerviosas lumbosacras en la resonancia magnética (RM). A nivel neurofisiológico, estos pacientes pueden presentar signos de desmielinización adquirida, pero es frecuente la afectación axonal temprana. En la tabla 4 se resumen las características clínicas de los diferentes tipos de NoA.

Los **anti-NF155** fueron inicialmente descritos en un subgrupo de pacientes que cumplían criterios de CIDP con una debilidad de predominio distal, temblor y ataxia de características cerebelosas (92). Asimismo, se observó que los pacientes con anti-NF155 son portadores con alta frecuencia del alelo HLA DRB1*15 (96). Un estudio reciente que incluye información clínica de 40 pacientes con anti-NF155 (97) confirmó que estos pacientes suelen ser jóvenes (con un porcentaje significativo por debajo de los 30 años), con debilidad distal, temblor y ataxia. Además, es frecuente la afectación de pares craneales (sobre todo parálisis facial) y hiperproteínorraquia marcada en LCR.

Los **anti-CNTN1** se describieron por primera vez en 2013 en tres pacientes con una neuropatía sensitivo-motora grave, con ataxia y mala respuesta a IgEV (35). Desde la primera descripción, se han descrito casos clínicos aislados o pequeñas series de pacientes (98–101). Además, se conoce que un grupo de pacientes con anticuerpos anti-CNTN1 tienen afectación renal asociada a la neuropatía, mayoritariamente en forma de glomerulonefritis membranosa (102–105). Un estudio reciente demuestra la presencia de inmunocomplejos con CNTN1 a nivel del glomérulo renal y describe los primeros casos de afectación renal aislada (sin neuropatía) (106).

Hace 10 años se describieron dos pacientes anticuerpos **anti-Caspr1** con una neuropatía inflamatoria dolorosa (107). Más adelante, gracias a la información de una cohorte de 15 pacientes (la más larga hasta la fecha), se observó que estos pacientes presentan una polineuropatía grave de inicio agudo o subagudo, caracterizada por afectación craneal, compromiso respiratorio y dolor neuropático (93). Aunque el epítipo principal es la proteína Caspr1, se ha demostrado que la detección de estos anticuerpos se optimiza mediante la expresión del complejo CNTN1/Caspr1 en los ensayos celulares (93). Además, se han descrito casos aislados de pacientes con reactividad frente a ambas proteínas, aunque su significado clínico aún está por investigar (101).

Los anticuerpos dirigidos contra isoformas nodales de neurofascina (NF140 y NF186) o **pan-neurofascina** (pan-NF) (NF155, 140 y 186) se han asociado con un fenotipo clínico característico. Estos pacientes se presentan normalmente con una neuropatía de inicio

agudo grave, en muchas ocasiones con un curso monofásico y que suele ser confundida con un SGB. La disautonomía es frecuente y algunos pacientes tienen afectación renal con un síndrome nefrótico (36,108).

Tabla 4. Características clínicas de las nodopatías autoinmunes. <i>Adaptado de Pascual-Goñi et al, 2024 (49).</i>			
	Características clínicas	Exploraciones	Tratamiento
Anti-NF155 (IgG4)	<ul style="list-style-type: none"> - Hombres jóvenes - Curso crónico - Debilidad distal - Ataxia cerebelosa y temblor - Asociado a HLA DRB1*15 	<ul style="list-style-type: none"> - LCR: proteínas muy altas - RM: captación raíces - Biopsia nervio: axonal 	<ul style="list-style-type: none"> - IgEV: poca/sin respuesta - Corticoides: respuesta parcial/buena - Rituximab: buena respuesta
Anti-CNTN1 (IgG4>IgG3)	<ul style="list-style-type: none"> - Debut subagudo - Tetraparesia + afectación craneal - Denervación precoz - Ataxia - Síndrome nefrótico - IgG3: etapa inicial 		
Anti-Caspr1 (IgG4>IgG3)	<ul style="list-style-type: none"> - Debut agudo/subagudo - Tetraparesia + afectación craneal - Ataxia sensitiva y temblor - Dolor neuropático - Afectación respiratoria 		
Anti-panNF (IgG1/IgG3/IgG4)	<ul style="list-style-type: none"> - Debut agudo/subagudo - Curso monofásico - Afectación craneal - Afectación respiratoria - Disautonomía - Síndrome nefrótico 		
Abreviaturas: NF155: neurofascina-155; pan-NF: pan-neurofascina; CNTN1: contactin-1; Caspr1: proteína asociada a contactin-1; NF140/186: neurofascina 140/186; LCR: líquido cefalorraquídeo, RM: resonancia magnética.			

Por último, recientemente, se ha descrito un potencial nuevo antígeno en las nodopatías autoinmunes: la proteína **LG14** (miembro de la familia LGI, del inglés *leucine-rich repeat*) (109). En su descripción, se postula que esta proteína se encuentra en el yuxtaparanodo de Ranvier y anticuerpos anti-LG14 están presentes en un subgrupo de pacientes con CIDP que no responden a terapias convencionales. Sin embargo, estos anticuerpos no han sido replicados y se requiere de más investigación para dilucidar su relevancia clínica y patogénica.

1.3.2.2. Patogenicidad de los anticuerpos en NoA

Hasta la fecha la patogenicidad se ha demostrado en los anti-NF155 y los anti-CNTN1. Los anticuerpos de las NoA son predominantemente IgG4, lo que apoya a su patogenicidad, salvo el pan-NF en que también es más frecuente otras subclase como la IgG1 y la IgG3 (tabla 4) (101). Aunque las IgG4 poseen una baja capacidad para activar el complemento y una afinidad reducida por receptores Fc, pueden interferir directamente con la función de su antígeno diana mediante bloqueo, neutralización o interrupción de interacciones proteína-proteína (29).

La patogenicidad de los **anticuerpos anti-NF155** se ha demostrado en modelos animales. En animales en periodo neonatal, la infusión de estos anticuerpos redujo los niveles de NF155 e impide la formación del paranodo, mientras que en adultos provoca la pérdida de paranodos y signos clínicos y neurofisiológicos de polineuropatía (110). Además, a diferencia de los anti-CNTN1, parece que los anticuerpos anti-NF155 bivalentes son los que producen un efecto patogénico, mientras que el intercambio del brazo Fab anula dicho efecto (111).

La patogenicidad de los **anticuerpos anti-CNTN1** se ha demostrado *in vitro* como *in vivo* (112). En primer lugar, se demostró que los anticuerpos anti-CNTN1 IgG4 invaden el paranodo (figura 12A) y esto aumenta de manera progresiva a medida que se aumenta el tiempo de incubación. Asimismo, en modelos animales, se demostró que la transferencia pasiva de anti-CNTN1 IgG4 produce una destrucción de los paranodos (figura 12B, 12C). A nivel clínico, los animales tras la transferencia de IgG4 desarrollan una neuropatía clínica y neurofisiológica, así como una ataxia de la marcha evidente, sobre todo cuando el subtipo de IgG anti-CNTN1 transferida es IgG4 (figura 12D). Además, recientemente se ha demostrado que la valencia de los anticuerpos anti-CNTN1 también tiene un papel importante en su patogenicidad. Un estudio reciente aporta evidencia de los anti-CNTN1

monovalentes ya son patogénicos, sin necesidad de ser bivalentes (como la NF155), y tienen capacidad de alterar la estructura del paranodo (113).

Finalmente, en el caso de los **anti-pan-NF**, a pesar de que no se ha podido demostrar *in vivo*, hay datos *in vitro* que apoyan su patogenicidad. Se ha demostrado que los anti-pan-NF tienen capacidad para unirse a la región nodal y paranodal en cocultivos mielinizantes (de ganglio raquídeo dorsal y CS), causando desorganización de los nodos de Ranvier y daño axoglial mediado por complemento (108).

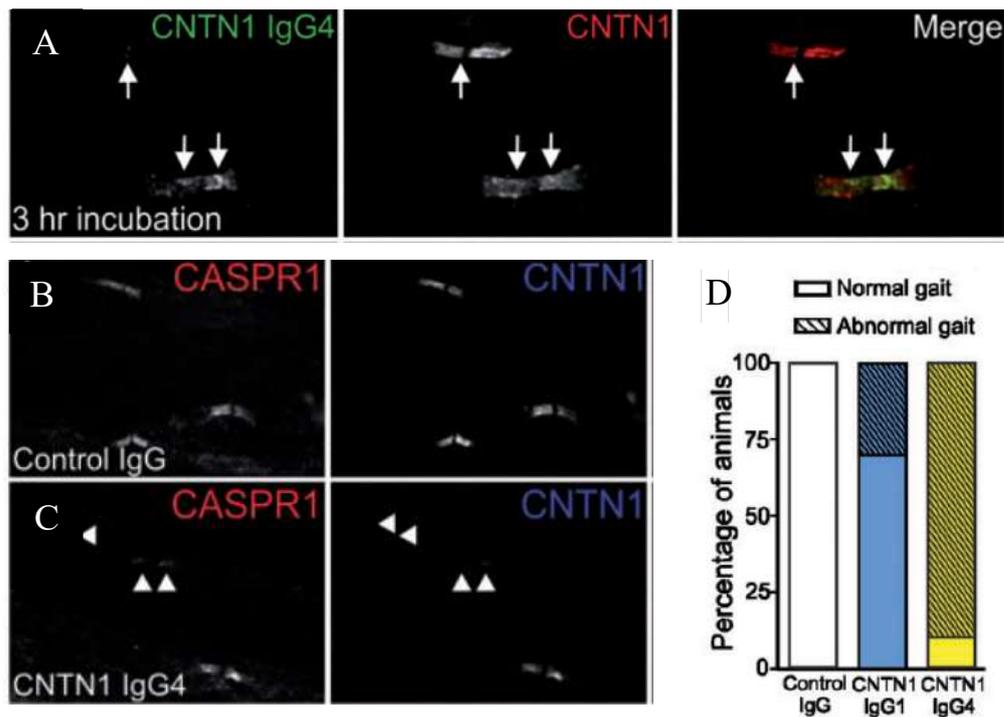


Figura 12. Patogenicidad de los anticuerpos anti-CNTN1. **Figura 12A:** nervios de ciático de rata incubados con anticuerpos anti-CNTN1. Los anticuerpos anti-CNTN1 penetran en el paranodo *in vitro* después de 3 horas de incubación. **Figura 12B, 7C:** fibras nerviosas de raíz L6 de animales control (B) vs animales anti-CNTN1+ (C). Se observa una destrucción de los paranodos en animales anti-CNTN1+. **Figura 12D:** evidencia clínica de alteración de la marcha de animales anti-CNTN1+ IgG4, comparado con anti-CNTN1+ IgG1 y animales control. (Adaptada de Manso et al 2016) (112).

1.3.2.3. Tratamiento y seguimiento en nodopatías autoinmunes

Toda la evidencia publicada hasta la fecha, demuestra que los pacientes con NoA suelen responder mal a terapias convencionales como las IgEV o los corticoides (93,97,108,114). Sin embargo, las cohortes publicadas son pequeñas y el seguimiento de estos pacientes a largo plazo es casi inexistente.

Los pacientes con anti-NF155 son de los que disponemos más información, gracias a la reciente publicación de una cohorte de 40 pacientes (97). En esta cohorte se evidenciaba que estos pacientes presentaban una neuropatía de carácter más crónico, con excelente respuesta a rituximab y con recaídas frecuentes y necesidad de retratamiento. En cambio, en el caso de los pacientes con anticuerpos pan-NF los pacientes se presentan con una neuropatía aguda, que en muchas ocasiones también requiere de rituximab, pero sin recaídas.

Sin embargo, en el caso de los anti-CNTN1 y anti-Caspr1 también hay evidencia anecdótica de que responden a rituximab, pero el seguimiento de estos pacientes es muy escaso.

1.4. BIOMARCADORES EN NEUROPATÍAS AUTOINMUNES

Los biomarcadores se definen como características biológicas que son medibles, objetivas y que traducen un proceso fisiológico, una condición patológica o una respuesta a un tratamiento. Los biomarcadores se utilizan para diagnóstico, pronóstico y monitorización de enfermedades, así como para predecir y evaluar la respuesta terapéutica (115). En neuropatías autoinmunes, son necesarios biomarcadores tanto para el diagnóstico como para la monitorización y pronóstico de estos pacientes.

Actualmente, existen ya biomarcadores conocidos en estos pacientes tales como los estudios neurofisiológicos o pruebas de imagen. Estas últimas han ganado mucho peso desde que en las últimas guías diagnósticas de CIDP las pruebas de imagen son un criterio de soporte para incrementar el nivel de certeza diagnóstica de CIDP posible a CIDP (65). En la ecografía de nervio de pacientes con CIDP se puede evidenciar un agrandamiento del nervio o del plexo braquial (116,117), y la RM de plexo puede mostrar un realce de contraste o una hiperintensidad en las raíces nerviosas, plexos braquiales o lumbares y de la cola de caballo (118,119).

Respecto a biomarcadores sanguíneos, los anticuerpos en neuropatías autoinmunes son los más reconocidos. Además, existen una serie de biomarcadores de daño axonal y mielínico que se han postulado útiles en estas enfermedades.

1.4.1. Autoanticuerpos como biomarcadores en neuropatías autoinmunes

Algunos anticuerpos contra proteínas del nervio actúan como biomarcadores en la práctica clínica habitual. Por un lado, algunos de ellos, como los anticuerpos contra proteínas del nodo de Ranvier, son biomarcadores diagnósticos, ya que ayudan a distinguir una NoA de

otras enfermedades similares como el SGB o la CIDP. Esto tiene implicaciones sobre el tratamiento ya que el abordaje es diferente.

Por otro lado, algunos anticuerpos se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Esto se ha demostrado en los anti-NF155 (97) y en los anti-pan-NF (108), en que caídas de los títulos de anticuerpos se correlacionan con una mejoría clínica, por lo que pueden emplearse como biomarcadores de monitorización de la actividad inmunológica de la enfermedad. Además, en el caso de los anti-NF155, también ayudan a identificar recaídas del paciente, muy útil para la práctica clínica habitual.

1.4.2. Biomarcadores de daño axonal

El daño axonal es el sustrato patológico responsable de la discapacidad a largo plazo de muchas enfermedades neurológicas, entre ellas las neuropatías autoinmunes. Se ha demostrado que el daño axonal es un marcador pronóstico independiente tanto en pacientes con SGB (120,121) , como en la CIDP (122). Por este motivo, la cuantificación del daño axonal mediante biomarcadores sería de gran utilidad para evaluación diagnóstica y pronóstica de este tipo de pacientes.

Los neurofilamentos son unos de los biomarcadores más prometedores para medir el daño axonal. Éstos son proteínas del citoesqueleto neuronal que se liberan al LCR y sangre cuando hay daño axonal neuronal. Se engloban dentro de los filamentos intermedios por su diámetro (aproximadamente 10 nm), que se sitúa entre el diámetro de los neurofilamentos de actina (6 nm) y los de miosina (15 nm) (123,124). Además, los neurofilamentos se caracterizan por tener una estructura compleja y por formar heteropolímeros. Los heteropolímeros están compuestos por cuatro subunidades: neurofilamentos de cadena pesada (NfH), neurofilamentos de cadena media (NfM), neurofilamentos de cadena ligera (NfL), la α -Internexina en el sistema nervioso central (SNC) y la periferina en el SNP, figura 11) (123,124).

La principal función de los neurofilamentos es la estabilización mecánica del citoesqueleto axonal. Además desempeñan múltiples funciones, incluyendo la modificación del diámetro axonal, el flujo y transporte axonal, el anclaje y la distribución de las mitocondrias, así como interacciones con proteínas de la mielina que regulan la expresión de las isoformas de neurofilamentos durante el desarrollo y la mielinización (123).

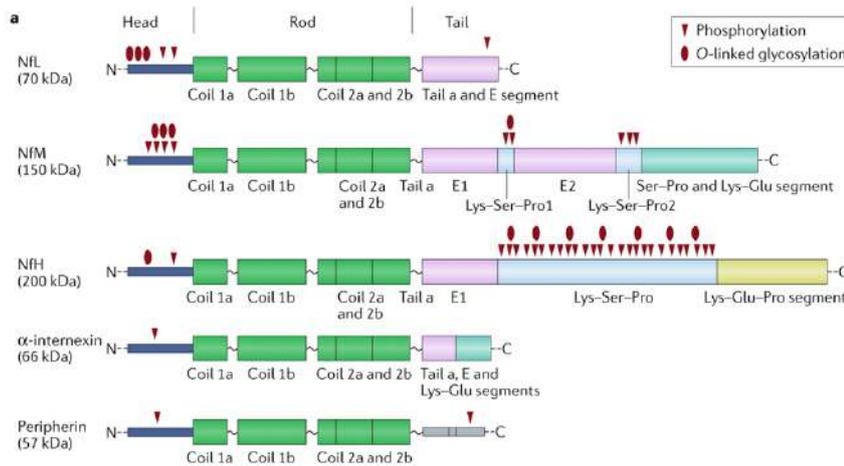


Figura 13. Estructura de los neurofilamentos. *Adaptada de Khalil et al, 2018 (124)*

1.4.2.1. Neurofilamentos de cadena ligera

De todos los neurofilamentos, los NfL son los que han demostrado ser de mayor utilidad como biomarcador de daño axonal en enfermedades neurológicas (125), ya que se expresan exclusivamente en neuronas. Se ha demostrado que los sNfL son útiles como biomarcador de actividad y pronóstico en enfermedades neuroinflamatorias del SNC como la esclerosis múltiple (126), y también son un biomarcador pronóstico útil en enfermedades neurodegenerativas (129), (130) (131).

En el campo de las neuropatías, los NfL han demostrado ser de utilidad en las neuropatías tanto autoinmunes (132–135) como genéticamente determinadas (127,128).

En el **SGB**, inicialmente se describieron series de pocos pacientes en los que parecía que los pacientes con niveles de NfL en LCR (132) y suero (133) tenían mayor discapacidad. Recientemente se ha publicado una serie de 98 pacientes con SGB (134) en la que se demostraba que los sNfL basales se correlacionaban con la gravedad de la enfermedad y con las formas axonales, además de ser un factor pronóstico independiente a largo plazo. Esto se ha confirmado con otro estudio con una cohorte más extensa (n=281) (135), que llega a las mismas conclusiones.

En la **CIDP**, los datos sobre el uso de sNfL son más limitados. Existen series cortas de pacientes en las que se demuestra que los NfL en suero de los pacientes con CIDP son un biomarcador de actividad (129), y podrían tener también un papel como biomarcador pronóstico (130). Sin embargo, en la CIDP la evidencia no es tan extensa como en el SGB

y se requieren de estudios con más pacientes y mejor caracterizados para conocer el papel de este biomarcador.

Respecto otras neuropatías autoinmunes, se debe destacar su uso en **NoA**. En pacientes con NoA anti-NF155 (97), se ha descrito que estos pacientes tienen niveles elevados de sNfL, y correlacionan con la actividad de la enfermedad, sin poder demostrar que sean un biomarcador pronóstico en este subgrupo de pacientes. Resultados similares se han encontrado en pacientes anti-pan-NF (108), con niveles muy elevados de sNfL en pacientes, relacionados con la actividad de la enfermedad, pero sin ser un claro biomarcador pronóstico. El rol de los sNfL como biomarcador en otras NoA no se ha investigado hasta el momento.

Se ha estudiado los niveles de sNfL en población sana tanto adulta (126) como pediátrica (131) (figura 14), lo que ha conseguido crear una base de datos poblacional. Esto permite extraer un percentil y un z-score de nuestro paciente y conocer si tiene valores fisiológicamente elevados (por edad o IMC) o traducen un daño axonal patológico. En la esclerosis múltiple, que es la enfermedad en la que el uso de los NfL está más extendido, se considera que z-scores por encima de 1.5 traducen un mal control de la enfermedad (126).

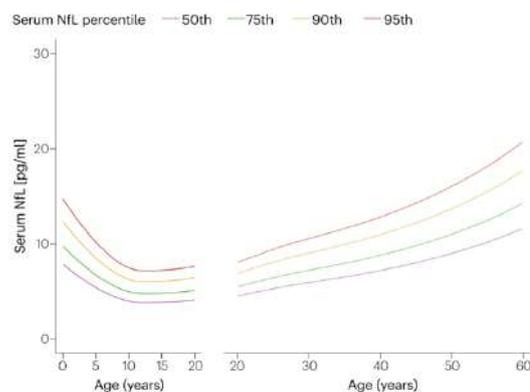


Figura 14. Niveles de NfL en suero en población sana dividido en percentiles.

Adaptada de Khalil et al, 2024 (123).

1.4.2.2. Otros biomarcadores de daño axonal

En los últimos años, se ha tratado de identificar otros biomarcadores de daño axonal más específicos del SNP que los NfL, que también pueden estar elevados en patología del SNC. La **periferina** es otro neurofilamento intermedio exclusivo del SNP). En 2023 se publicó un primer estudio que postula que los niveles de periferina en suero (medidos por SiMoA) pueden ser un buen biomarcador de daño axonal en patología del SNP ya que se

describieron niveles elevados en pacientes con SGB comparado con controles sanos y con pacientes con patología del SNC (132). De cara a dilucidar el papel de este biomarcador, son necesarias series más largas de pacientes de las que no disponemos en la actualidad.

1.4.3. Biomarcadores de daño mielínico

La necesidad de disponer de un biomarcador fiable de daño mielínico es crucial para diferenciarlo del daño axonal primario, especialmente en aquellos casos en los que las pruebas complementarias no ofrecen información concluyente.

Durante los procesos de desmielinización, diversos componentes de la mielina y el axón se liberan como consecuencia del daño a las CS. La vaina de mielina está compuesta aproximadamente por un 70% de lípidos (gangliósidos, fosfolípidos, esfingomielina) y un 30% de proteínas estructurales (P0, P2, PMP22 o MAG) y nodales, que pueden servir como biomarcadores específicos de daño (133). Estos componentes se pueden detectar en LCR, suero e incluso biopsias de nervios periféricos (134), lo que permitiría evaluar tanto la gravedad de la desmielinización como la eficacia de tratamientos.

De todos ellos, la **esfingomielina** es de los biomarcadores de desmielinización más prometedores. Se ha evidenciado niveles elevados de esfingomielina en LCR en pacientes con CIDP y SGB desmielinizante, al compararse con otras enfermedades neurológicas no desmielinizantes (135,136).

Por otra parte, entre las proteínas nodales o paranodales, destaca la concentración de **CNTN1 soluble** como biomarcador prometedor. La CNTN1 es una proteína secretada que normalmente se encuentra anclada a la membrana del axón en el paranodo de las fibras nerviosas mielinizadas. Sin embargo, también existe una fracción soluble que se puede medir en suero (137). Debido a que la CNTN1 también está expresada en fibras mielinizadas del SNC, inicialmente se estudió como biomarcador soluble en esclerosis múltiple, y se demostró su utilidad como biomarcador pronóstico en esta enfermedad (138,139). Posteriormente, se demostró que los pacientes con nodopatías autoinmunes tenían niveles extremadamente bajos de CNTN1 soluble (sCNTN1) si se comparaba con pacientes con CIDP, especialmente aquellos con una NoA anti-CNTN1 (140). Este fenómeno sugiere que los anticuerpos anti-CNTN1 promueven la internalización o la degradación de la proteína. Sin embargo, la concentración de sCNTN1 es baja en pacientes con otras NoA como la anti-NF155, por lo que se esta reducción podría estar relacionada con otros factores más allá de los anticuerpos.

1.5. EL FUTURO DE LAS NEUROPATÍAS AUTOINMUNES

Tal y como se ha expuesto en la introducción de esta tesis, el campo de neuropatías inflamatorias se encuentra en un momento de transformación, impulsado por los continuos avances en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos, clínicos y aparición de nuevos tratamientos.

A pesar de estos avances, persisten importantes necesidades no cubiertas en el campo de las neuropatías inflamatorias, especialmente en la CIDP, donde la heterogeneidad clínica y la ausencia de biomarcadores diagnósticos fiables dificultan tanto el diagnóstico precoz como las decisiones terapéuticas. En este contexto, emerge la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores como los autoanticuerpos, que ofrecen la posibilidad de conocer nuevos mecanismos fisiopatológicos, predecir la respuesta a tratamiento y guiar en la práctica clínica.

Por otro lado, existen ya autoanticuerpos conocidos en pacientes con NoA, tales como los anti-CNTN1, los anti-Caspr1 o los anti-NF155. De éstos últimos disponemos ya una cohorte extensa que nos permite guiar el tratamiento y la monitorización de estos pacientes, que ha resultado de gran ayuda en la práctica clínica habitual. Sin embargo, en el resto de los anticuerpos resulta esencial ampliar y describir en detalle nuevas cohortes de pacientes, así como definir el fenotipo clínico correctamente y encontrar biomarcadores que puedan ayudar a la precisión diagnóstica y la predicción de respuesta a tratamien

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

1. Las neuropatías inflamatorias son un grupo heterogéneo de enfermedades agrupadas bajo categorías diagnósticas definidas en base a criterios clínicos, electrofisiológicos e inmunológicos.
2. La definición de los autoanticuerpos en neuropatías inflamatorias es fundamental de cara a la correcta caracterización, así como para comprender su fisiopatología. Existen nuevas técnicas de descubrimiento de nuevos autoanticuerpos que pueden ser de utilidad en este campo.
3. La NoA definida por la presencia de anticuerpos anti-CNTN1 es una entidad característica y diferenciada tanto clínica como biológicamente, con un comportamiento diferente al resto de neuropatías autoinmunes.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Profundizar en el conocimiento de anticuerpos y biomarcadores en neuropatías inflamatorias, tanto de anticuerpos conocidos como nuevos, evaluando su capacidad diagnóstica, pronóstica y de respuesta terapéutica.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Demostrar la utilidad de los microarrays celulares en el descubrimiento de nuevas reactividades antigénicas en neuropatías autoinmunes.
2. Identificar nuevos autoanticuerpos con potencial relevancia clínica en CIDP y otras neuropatías autoinmunes.
3. Describir las características clínicas y biológicas de la NoA mediada por anticuerpos anti-CNTN1.

4.COMPENDIO DE PUBLICACIONES

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

4.1. ARTÍCULO 1.

Membrane Proteome-Wide Screening of Autoantibodies in CIDP Using Human Cell Microarray Technology.

Caballero-Ávila M, Lleixà C, Pascual-Goñi E, Martín-Aguilar L, Vidal-Fernandez N, Tejada-Illa C, Collet-Vidiella R, Rojas-Garcia R, Cortés-Vicente E, Turon-Sans J, Gallardo E, Olivé M, Vesperinas A, Carbayo Á, Llansó L, Martínez-Martínez L, Shock A, Christodoulou L, Dizier B, Freeth J, Soden J, Dawson S, Querol L.. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2024 May;11(3):e200216.

doi: 10.1212/NXI.0000000000200216.

Membrane Proteome-Wide Screening of Autoantibodies in CIDP Using Human Cell Microarray Technology

Marta Caballero-Ávila, MD,* Cinta Lleixà, PhD,* Elba Pascual-Goñi, MD, PhD, Lorena Martín-Aguilar, MD, PhD, Núria Vidal-Fernandez, RN, MSc, Clara Tejada-Illa, MSc, Roger Collet-Vidiella, MD, Ricardo Rojas-Garcia, MD, PhD, Elena Cortés-Vicente, MD, PhD, Janina Turon-Sans, MD, Eduard Gallardo, PhD, Montse Olive, MD, PhD, Ana Vesperinas, MD, Álvaro Carbayo, MD, Laura Llansó, MD, Laura Martínez-Martínez, PhD, Anthony Shock, PhD, Louis Christodoulou, Benjamin Dizier, Jim Freeth, Jo Soden, Sarah Dawson, and Luis Querol, MD, PhD

Correspondence
Dr. Querol
lquerol@santpau.cat

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2024;11:e200216. doi:10.1212/NXI.000000000200216

Abstract

Background and Objectives

Autoantibody discovery in complex autoimmune diseases is challenging. Diverse successful antigen identification strategies are available, but, so far, have often been unsuccessful, especially in the discovery of protein antigens in which conformational and post-translational modification are critical. Our study assesses the utility of a human membrane and secreted protein microarray technology to detect autoantibodies in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP).

Methods

A cell microarray consisting of human embryonic kidney-293 cells expressing >5,000 human proteins was used. First, a validation step was performed with 4 serum samples from patients with autoimmune neuropathy (AN) to assess the ability of this technology to detect circulating known autoantibodies. The ability of the cell microarray technology to discover novel IgG autoantibodies was assessed incubating the array with 8 CIDP serum samples. Identified autoantibodies were subsequently validated using cell-based assays (CBAs), ELISA, and/or tissue immunohistochemistry and analyzed in a cohort of CIDP and AN (n = 96) and control (n = 100) samples.

Results

Serum anti-contactin-1 and anti-neurofascin-155 were detected by the human cell microarray technology. Nine potentially relevant antigens were found in patients with CIDP without other detectable antibodies; confirmation was possible in six of them: ephrin type-A receptor 7 (EPHA7); potassium-transporting ATPase alpha chain 1 and subunit beta (ATP4A/4B); leukemia-inhibitory factor (LIF); and interferon lambda 1, 2, and 3 (IFNL1, IFNL2, IFNL3). Anti-ATP4A/4B and anti-EPHA7 antibodies were detected in patients and controls and considered unrelated to CIDP. Both anti-LIF and anti-IFNL antibodies were found in the same 2 patients and were not detected in any control. Both patients showed the same staining pattern against myelinating fibers of peripheral nerve tissue and of myelinating neuron-Schwann cell cocultures. Clinically relevant correlations could not be established for anti-LIF and anti-IFNL3 antibodies.

Discussion

Our work demonstrates the utility of human cell microarray technology to detect known and discover unknown autoantibodies in human serum samples. Despite potential CIDP-associated

*These authors contributed equally to this work.

From the Neuromuscular Diseases Unit (M.C.-Á., C.L., E.P.-G., L.M.-A., N.V.-F., C.T.-I., R.C.-V., R.R.-G., E.C.-V., J.T.-S., E.G., M.O., A.V., Á.C., L.L., L.Q.), Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Neuromuscular Diseases (C.L., R.R.-G., E.C.-V., J.T.-S., E.G., M.O., L.Q.), Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid; Department of Immunology (L.M.-M.), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; UCB Pharma (A.S., L.C., B.D.), Slough; and Retrogenix (Charles River's company) (J.F., J.S., S.D.), United Kingdom.

Go to [Neurology.org/NN](https://www.neurology.org/NN) for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

The Article Processing Charge was funded by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Copyright © 2024 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology.

1

Glossary

AN = autoimmune nodopathy; **CBA** = cell-based assay; **CIDP** = chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy; **DRG** = dorsal root ganglia; **EPHA7** = ephrin type-A receptor 7; **HEK293** = human embryonic kidney-293; **IHC** = immunohistochemistry; **LIF** = leukemia-inhibitory factor; **MS** = multiple sclerosis; **OD** = optical density; **SCs** = Schwann cells.

autoantibodies (anti-LIF and anti-IFNL3) being identified, their clinical and pathogenic relevance needs to be elucidated in bigger cohorts.

Introduction

Autoantibodies play a crucial role in the pathogenesis of many autoimmune diseases, including neurologic ones, and are used as biomarkers for their diagnosis, characterization, prognosis, and treatment.¹ However, identifying clinically relevant autoantibodies in rare and heterogeneous autoimmune diseases is challenging.

The discovery of autoantibodies as diagnostic biomarkers for autoimmune diseases has been an important topic of research for decades. Diverse technologies and experimental approaches have been used.² Immunoprecipitation followed by antigen identification with mass spectrometry has been one of the most common strategies to identify novel protein antigens.³⁻⁵ More recently, new autoantibody discovery technologies have emerged, such as protein microarrays and phage-immunoprecipitation techniques.^{6,7} Clinically relevant and pathogenic autoantibodies often target conformational epitopes displayed in the cell surface. So far, high-throughput autoantibody screening technologies were limited by the non-natural conformation in which the antigens are presented. Human cell microarray technologies expressing a large set of membrane and secreted proteins have been developed to detect the on-target and off-target effects of monoclonal antibodies or therapies based in recombinant proteins.⁸ This technique involves the arraying on slides of large libraries of mammalian expression vectors encoding human membrane and secreted protein cDNAs, over which human embryonic kidney-293 (HEK293) cells are grown with a transfection-enabling reagent to enable expression of the cDNA-encoded proteins on the cell surface. These arrays are then used for screening of reactivities against all cell-expressed proteins. These features make this technology suitable for autoantibody screening and capable to overcome the limitations of traditional techniques. While protein microarrays have been used for the identification of novel autoantibodies before,^{9,10} human cell microarray technology has never been used.

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is a rare neuroimmunologic disorder of the peripheral nervous system, in which autoantibodies seem to play an important role on its pathophysiology.^{11,12} Autoantibodies targeting cell adhesion molecules of the node of Ranvier were described in patients with CIDP leading to an emerging disease category: autoimmune nodopathy (AN).^{13,14} These antibodies

are present only in 5–10% of patients fulfilling CIDP diagnostic criteria and target proteins such as contactin 1 (CNTN1),^{3,15} contactin-associated protein 1 (Caspr1),^{16,17} neurofascin 155 (NF155),^{18,19} or pan-neurofascin (pan-NF)⁴ and are associated with specific clinical phenotypes that are different from typical CIDP. However, the target antigen(s) remain unknown in the majority of patients with CIDP.

In this context, the aim of our study was to evaluate the human cell microarray technology for autoantibody discovery, taking CIDP as a paradigmatic example of a rare and complex autoimmune disease in which a diverse set of potentially relevant antigens may play a role in its pathogenesis.

Methods

Experimental Design and Samples

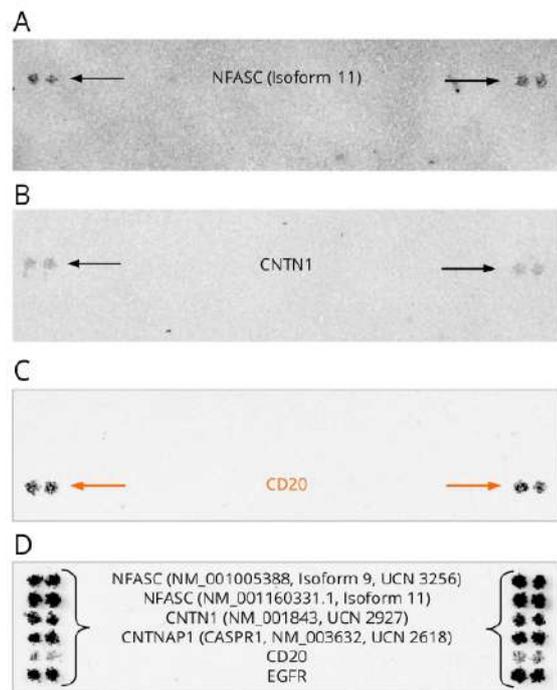
This study was designed in 3 steps: (1) validation of the human cell microarray technology in samples with known autoantibodies, (2) autoantibody discovery in CIDP samples, and (3) confirmatory experiments. In the first phase, 4 serum samples from AN patients with known antibodies (1 anti-NF155, 1 anti-NF140/186, 1 anti-CNTN1, and 1 anti-Caspr1) were included. In the discovery phase, a total of 8 CIDP patients' serum samples were included: 4 from patients with typical CIDP and 4 from patients with CIDP that showed IgG reactivity against neural structures but in which the target antigen was not known²⁰ (eFigure 1).

In the confirmatory phase, 96 serum samples were included. These samples included sera from 83 patients with CIDP (including the ones used in the discovery stage) and 13 patients with AN, all of them fulfilling the European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society Task Force 2021 revised diagnostic criteria²¹ and followed in our center. The control group included 100 serum samples from healthy controls (HCs, n = 40), patients with multiple sclerosis (MS, n = 40), and patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS, n = 20), obtained from our biobank (Spanish Ministry of Health code C.0002365).

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

Written informed consents were obtained from all patients for sample handling and data collection. Participation in the study

Figure 1 Prescreen of Autoimmune Nodopathy Samples With a Known Antibody



Prescreen of anti-NF155 (A) and anti-CNTN1 (B) CIDP serum samples against HEK293 cells overexpressing neurofascin (isoform 9 and 11), CNTN1, and Caspr1 and CD20 and EGFR. Screening of rituximab biosimilar (anti-CD20; C) was performed as a positive control and transfection control (D). CIDP = chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.

was conducted under a protocol approved by the Institutional Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (code of approval IIBSP-NAI-2022-88).

Human Cell Microarray Technology

Discovery of IgG autoantibodies was performed with the Retrogenix cell microarray technology.⁸ This approach included an initial prescreen step to assess sample background reactivity and dilution selection. Then, the 4 AN serum samples were added to slides of fixed HEK293 cells overexpressing NF155, NF186, CNTN1, and Caspr1 (as problem samples) and CD20 and EGFR (as positive and transfection controls, respectively). After this prescreen step, the 8 CIDP serum samples without known autoantibodies were screened against fixed HEK293 cells/slides expressing duplicate 5,861 human plasma membrane proteins and cell surface-tethered human-secreted proteins, plus 371 human heterodimers. All transfection efficiencies exceeded the minimum quality threshold. An AlexaFluor647 anti-human IgG Fc detection antibody was used to detect IgG binding to the slides. Reactivities found were confirmed by a second analysis that consisted of a new screening of all the samples (4 AN and 8 CIDP) against HEK293 cells expressing only the proteins that had shown reactivity.

Reactivities were classified as specific and nonspecific and divided by intensity (very weak, weak, medium, and strong). Reactivities that were considered relevant were the ones that were specific when appeared in duplicate and when intensity was weak or higher.

Cell-Based Assays

Reactivities obtained in the discovery phase were validated by cell-based assay (CBA) and/or ELISA (eTable 1).

In CBA, mammalian expression vectors encoding human LIF, ATP4A+ATP4B, NPR3, or TNFSF4 were transfected into HEK293 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA). Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.3% TritonX-100 if needed, and blocked. ICC experiments were performed using patients' sera and appropriate primary and secondary antibodies (eTable 1).

ELISA

Maxisorb 96-well ELISA plates (Thermo Fisher Scientific, NUNC, Denmark) were coated overnight with LIF, EPHA7, PIP, IFNL1, or IFNL3 recombinant proteins (eTable 1). Wells were blocked with 5% non-fat milk in PBS 0.1% Tween20 for 1 hour, incubated with diluted sera for 1 hour, and then incubated with peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG secondary antibodies for 1 hour at room temperature. ELISA was developed with tetramethylbenzidine solution (BioLegend, CA), and the reaction was stopped with 25% sulfuric acid. Optical density (OD) was measured at 450 nm in a Multiscan ELISA reader. Samples were considered positive by ELISA when they had a ΔOD higher than the average healthy control ΔOD plus 2 standard deviations. To calculate the antibody titers, the ELISA was performed with different serum concentrations (range 1/100–1/24300).

Peripheral Nerve and Stomach Tissue Immunohistochemistry

Sera from patients showing positivity against LIF were used to perform nerve tissue immunohistochemistry (IHC) on macaque peripheral nerve preparations. IHC was also performed on mouse stomach preparations to assess gastric mucosal antibodies in sera from patients showing positivity against the ATP4A/4B complex.

Macaque peripheral nerve slides and mouse stomach slides (Inova Diagnostics, San Diego) were blocked with 5% normal goat serum in PBS, followed by incubation with patients' sera at 1/40 for peripheral nerve tissue and 1/80 for stomach tissue. To study the staining pattern, peripheral nerve tissue slides were also incubated with rabbit anti-human S100 antibodies (ab52642, Abcam) at 1/50 to stain Schwann cells (SCs). Monkey-adsorbed goat anti-human IgG AF488 (Southern Biotech, AL) and goat anti-rabbit IgG AF594 were used as secondary antibodies in peripheral nerve tissue and goat anti-human IgG AF488 in mouse stomach slides, all at a 1/500 concentration. Finally, slides were mounted with Fluoromount and examined by 2 independent

Table Clinical and Laboratory Features, and Protein Reactivities of Patients With CIDP Without a Known Antigen Screened in Human Cell Microarray

	Sex	Age at onset (y)	Time from onset to sample	Treatment at the time of sample	IgG reactivity against neural structures	Protein reactivities found in human cell microarray	Maximum reactivity intensity detected
Patient 1	Female	30	14 y	IVIg, steroids	—	No specific hits identified	—
Patient 2	Male	51	1 y	IVIg, steroids	—	Ephrin type-A receptor 7	Weak
Patient 3	Male	67	2 y	IVIg, steroids	—	Atrial natriuretic peptide receptor 3	Weak
						Potassium-transporting ATPase subunit beta	Weak
						Ephrin type-A receptor 7	Weak
						Potassium-transporting ATPase alpha chain 1+potassium-transporting ATPase subunit beta	Medium
Patient 4	Female	31	12 y	IVIg	—	Ephrin type-A receptor 7	Weak
Patient 5	Male	55	10 y	IVIg	Monkey cerebellum	No specific hits identified	—
Patient 6	Male	62	6 y	IVIg, steroids	Human Schwann cell line	Ephrin type-A receptor 7	Weak
Patient 7	Female	63	Onset	None	Human Schwann cell line	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4	Weak
						Interferon lambda 1	Weak
						Interferon lambda 2	Weak
						Interferon lambda 3	Weak
						Prolactin-inducible protein	Weak
						Leukemia inhibitory factor	Weak/Medium
Patient 8	Male	51	8 y	None	Rat dorsal root ganglion neurons	Ephrin type-A receptor 7	Weak

Abbreviations: CIDP = chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy; IVIg = IV immunoglobulin.

observers who were not blinded for diagnosis. Images were obtained with an Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Myelinating Neuron-Schwann Cell Coculture Immunocytochemistry

Dorsal root ganglia (DRG) neuron and SC mixed cultures were prepared from E16 rat embryos as reported elsewhere.²²

Live cocultures were then incubated overnight with patients' sera diluted 1/100 in a myelinating medium at 37°C. Cells were then fixed for 20 minutes with 4% PFA, permeabilized for 10 minutes with methanol at -20°C, and blocked for 1 hour with 5% normal goat serum in PBS. Primary antibody incubation with anti-myelin basic protein (808401, Biogen) and anti-Caspr1 (ab34151, Abcam) at 1/300 was performed for 1 hour at room temperature. After washing, goat anti-human IgG AF488, goat anti-rabbit IgG AFS94, and goat anti-mouse IgG AF647 were used as secondary antibodies at a 1/500 concentration.

Coverslips were mounted with Fluoromount and examined by 2 independent observers who were not blinded for diagnosis. Images were obtained with an Olympus BX51 Fluorescence Microscope.

Data Availability

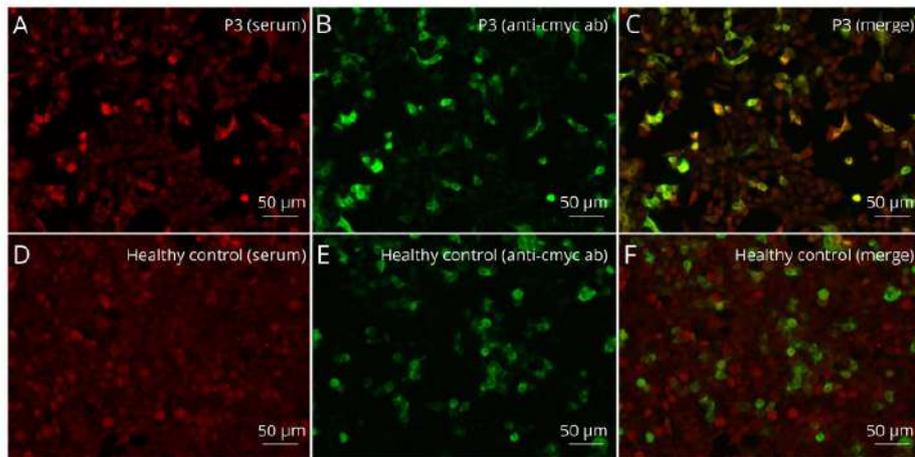
Anonymized data not published within this article will be made available by request from any qualified investigator.

Results

Human Cell Microarray Technology Validation Phase

To assess the ability of the cell microarray technology to identify known autoantibodies, serum samples of patients with AN were incubated with slides of fixed HEK293 cells overexpressing NF155, NF186, CNTN1, and Caspr1 and CD20 and EGFR. Sera with anti-NF155 and anti-CNTN1 antibodies showed strong and specific reactivity with NF155 and medium and specific reactivity with CNTN1, respectively

Figure 2 Immunocytochemistry of Anti-ATP4A/4B Antibodies



HEK293 cells were cotransfected with myc-DDK-tagged vectors ATP4A and ATP4B, double-stained with serum IgG (A, C) and with commercial antibody against c-myc (B, D). Patient 3 IgG binds to transfected cells (A), and colocalizes with c-myc (B); in contrast with the healthy control (D), that does not show any reactivity against ATP4A/4B-transfected cells.

(Figure 1). No reactivities were found on incubation of anti-NF140/186 and anti-Caspr1 sera.

Autoantibody Discovery Phase

To then assess the ability of the cell microarray technology to discover novel autoantibodies, sera from 8 patients with CIDP were incubated with the human cell microarray. In total, 31 hits (potential antigens) were identified. A second analysis screened all 12 serum samples (CIDP and AN) against HEK293 cells expressing these 31 hits plus NF186, NF155, CNTN1, and Caspr1. In this step, AN serum samples behaved as in the validation phase; 3 of the 4 AN samples also reacted against Ephrin type-A receptor 7 (EPHA7).

Protein hits confirmed in the second analysis with the human cell microarray in the 8 CIDP samples with unknown autoantibodies are summarized in the Table.

Confirmatory Experiments

All confirmed hits presented in the Table were included in the confirmatory experiments with ELISA or CBA. If a specific hit was confirmed (by ELISA or CBA) in the original sample where it was detected, 96 serum samples from patients with CIDP and AN (CIDP-AN cohort) and 100 control samples were then tested against the confirmed hit.

Unspecific Autoantibodies

Anti-EPHA7 antibodies were detected in 5 of 8 patients in the discovery phase (Table). ELISA was used to confirm the presence of antibodies against EPHA7, and only one of these patients was positive (patient 3 in the Table). From all the patients with CIDP-AN (n = 96) and controls (n = 100), one more patient with CIDP was positive for anti-EPHA7 antibodies by ELISA

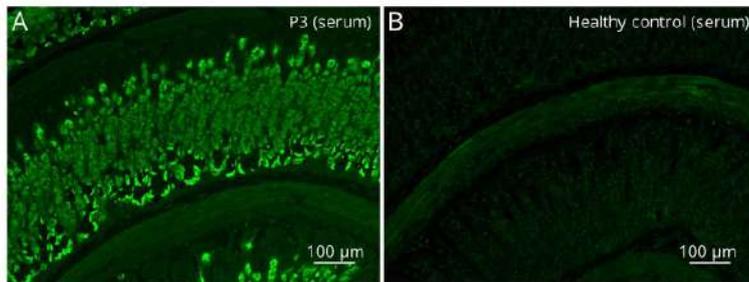
(2/96) and 1 serum from the control group (1/100, 1 HC). This reactivity was then ruled out as disease-specific, and no more confirmatory experiments were performed.

Antibodies targeting the ATP4A/4B complex detected in patient 3 were confirmed by ICC of ATP4A/4B-cotransfected HEK293 cells (Figure 2). No reactivity was found against HEK293 cells transfected with ATP4A or ATP4B alone. We analyzed the presence of anti-ATP4A/4B antibodies by ICC in all patients with CIDP-AN (n = 96) and controls (n = 100). One patient with AN (anti-NF155+; 2/96) and 3 controls (3/100, 2 HCs and 1 patient with MS) were positive for anti-ATP4A/4B antibodies. None of the patients positive for anti-ATP4A/4B had gastric symptoms. Antibodies targeting ATP4A/4B have recently been associated with atrophic gastritis because this complex is present in gastric parietal cells.^{23,24} For this reason, we performed IHC of mouse stomach slides and found that all patients and controls (n = 5) with antibodies against the ATP4A/4B complex showed reactivity against gastric parietal cells (Figure 3). Although this reactivity was confirmed, it was considered unrelated to CIDP.

Autoantibodies Detected Only in Patients With CIDP

Patient 7 showed reactivity against the leukemia-inhibitory factor in the discovery phase. This reactivity was confirmed by ELISA. An additional patient with anti-LIF antibodies was identified by ELISA (2/96) while none of the control sera tested reacted against LIF (0/100). Anti-LIF antibodies were additionally confirmed in these 2 patients with an in-house LIF-CBA (Figure 4). Patient 7 (anti-LIF+ patient I) did not have any previously known antibody while the other patient (anti-LIF+ patient II) was also positive for anti-Caspr1 antibodies.

Figure 3 Anti-ATP4/4B-Positive Patient Reactivity Against Stomach Tissue



Mouse stomach preparation stained with patient 3 serum in IgG (A) and healthy control (B). Patient 3 with anti-ATP4A/4B antibodies reacts against gastric parietal cells (A) while a healthy control negative for anti-ATP4A/4B does not (B).

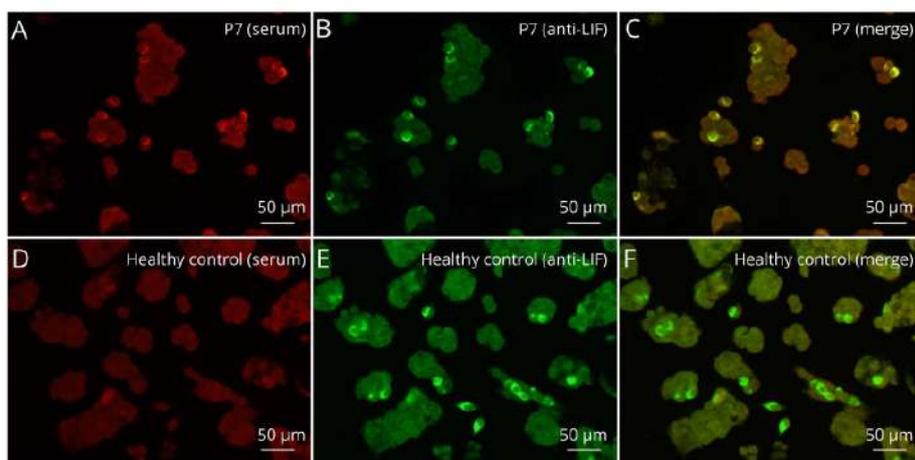
Both patients were positive for anti-LIF in the first sample (at disease onset) when treatment had not been initiated. Anti-LIF IgG titers were 1/8,100 for anti-LIF patient I and 1/900 for anti-LIF patient II. Anti-LIF antibody reactivity disappeared in both patients in samples collected on successful treatment. The role of LIF protein in the nervous system has been studied previously, and it seems to play a role in demyelination/remyelination.^{25,26} Thus, we decided to study the reactivity of these patients' sera against peripheral nerve tissue. Sera from both anti-LIF+ patients showed strong IgG reactivity against the macaque peripheral nerve with a pattern of staining that suggested binding to myelin 27 (Figure 5). We also found that both patients showed reactivity against myelin in myelinating DRG/SC cocultures (Figure 6). Samples collected after treatment (that were negative for anti-LIF) showed no reactivity against myelin.

Anti-LIF+ patients did not have common clinical features. Anti-LIF patient I presented with an acute ataxic neuropathy that

subsequently relapsed 3 months later, fulfilling CIDP criteria. Anti-LIF patient II presented with a sensory motor neuropathy with proximal and distal weakness and was diagnosed with typical CIDP. Clinical features of both patients are summarized in eTable 2.

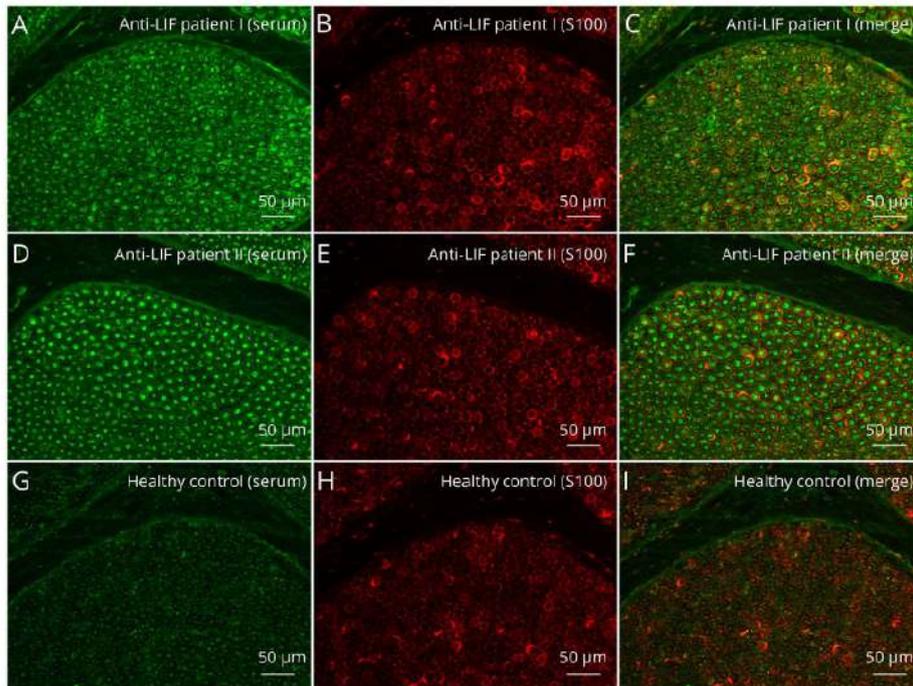
The same 2 patients who reacted against LIF also had antibodies against interferon lambda 1 and 3. Reactivity against IFNL1 and IFNL3 detected in patient 7 in the discovery phase was confirmed by ELISA. We did not test reactivity of patient 7 against IFNL2 because IFNL2 and IFNL3 share over 95% of the sequence.²⁸ Sequence identity between IFNL1 and IFNL2 and between IFNL1 and IFNL3 were 72.25% and 73.30%, respectively, suggesting that these hits were identified as a result of the binding of an autoantibody targeting a common epitope. Therefore, we used only the IFNL3 ELISA to test the entire cohort of patients with CIDP-AN and controls. When testing the full cohort of patients and controls, one more patient tested

Figure 4 Immunocytochemistry of Anti-LIF Antibodies



HEK293 LIF-transfected cells, double-stained with serum (A, C) and with commercial antibody against LIF (B, D). Patient 7 IgG binds to transfected cells (A), and colocalizes with LIF (B); in contrast with the healthy control (D), that does not show any reactivity against LIF-transfected cells. LIF = leukemia inhibitory factor.

Figure 5 Anti-LIF+ Patients' Reactivity Against Peripheral Nerve Tissue



Macaque peripheral nerve sections double stained in green with anti-LIF+ patient I serum in IgG (A), anti-LIF+ patient II (D), and healthy control (G) and in red with S100 (B, E, H). LIF = leukemia-inhibitory factor.

positive for anti-IFNL3 antibodies by ELISA (2/96) while none of the controls showed reactivity (0/100). It is of interest that the patients testing positive for anti-IFNL3 were the same patients who tested positive for anti-LIF.

Nonconfirmed Reactivities

All other reactivities found in the discovery phase were not confirmed (either by CBA or ELISA).

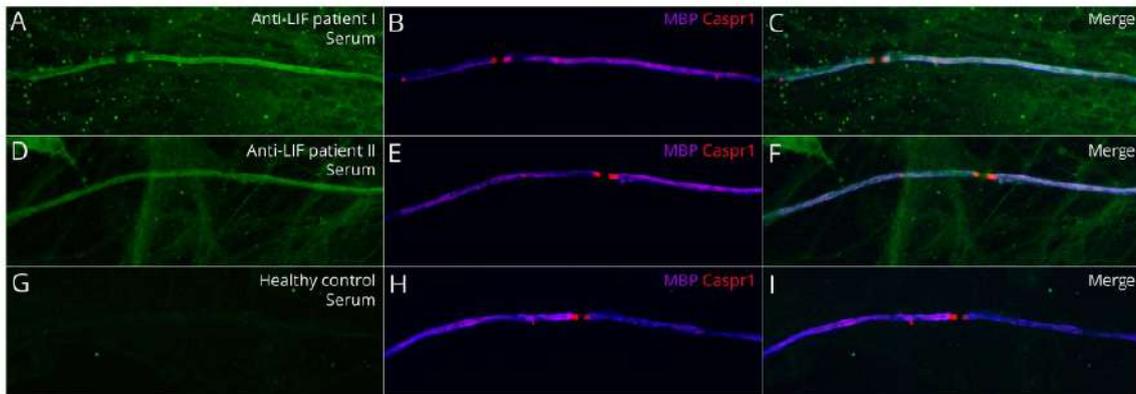
Discussion

Our work, using CIDP as a paradigmatic example of a rare and heterogeneous autoimmune disease without a known antigen, validates the ability of the human cell microarray technology to detect novel autoantibodies. First, using patients with AN, we demonstrated that the technology is able to detect previously known autoantibodies. Then, we demonstrated that novel autoantibodies can be discovered with the human cell microarray because we found 9 potential reactivities, and confirmation was possible in six of them. Although the 6 confirmed reactivities were proven with other different techniques, supporting their presence in serum of the tested patients, only anti-LIF and anti-IFNL were observed in the CIDP-AN cohort (and not in controls). The clinical and pathogenic relevance to CIDP of these antibodies is unclear and needs to be elucidated in larger cohorts.

Autoantibody discovery techniques have changed substantially in the past few decades. The human cell microarray technology has appeared as a new technique to screen for on-target and off-target reactivity of monoclonal antibodies, recombinant proteins, or other drugs against membrane and secreted proteins. The principal goal of this technology is to represent the maximum coverage of the human membrane proteome in a more physiologic environment. Our study provides a proof of principle that this technology is useful to screen human sera for autoantibody discovery purposes in autoimmune diseases, including neuroimmune disorders.

In our work, 4 sera from patients with AN were used to validate the technique. Specific reactivity against the known antigen was shown in the samples harboring anti-NF155 and anti-CNTN1 antibodies. No other reactivities were found, apart from EPHA7 that was considered unspecific. However, samples harboring anti-Caspr1 and anti-NF140/NF186 antibodies did not show reactivity. First of all, a recent inter-laboratory validation study²⁹ found that performance of the CBA is decreased when sera are incubated with fixed cells (in comparison with live CBA). The human cell microarray technology expresses the proteins in fixed cells; this may have played a role in the absence of reactivity in anti-Caspr1 and anti-NF140/186 serum samples as well. As recently described,¹⁷ detection of anti-Caspr1 antibodies by CBA is

Figure 6 Anti-LIF+ Patients' Reactivity Against Myelinating Neuron-Schwann Cell Cocultures



Neuron-Schwann cell cocultures triple stained in green with anti-LIF patient I serum in IgG (A), anti-LIF patient II (D), and healthy control (G) and in red with anti-Caspr1 and in purple with anti-myelin basic protein (MBP) (B, E, H). LIF = leukemia-inhibitory factor.

improved when Caspr1 and CNTN1 (that form a complex) are cotransfected, compared with transfection of Caspr1 only. Human cell microarray used in our work expressed Caspr1 or CNTN1 transfected alone, and that could explain the absence of reactivity when screening the anti-Caspr1+ serum sample. Along the same lines, we found several samples reacting against the ATP4A and ATP4B subunits of the gastric proton pump. The reactivity of these antibodies was significantly improved again when both subunits were cotransfected. Although some heterodimers are represented in the human cell microarray, these 2 findings suggest that future versions of these technologies should aim to include a growing list of multimeric protein complexes to make them even more efficient.

Sera harboring antibodies against NF140/186 bind to a common epitope of the 3 neurofascin isoforms (NF186, NF155, NF140). Apart from the fixed cells issue explained before, the titers of the AN patient with antiNF140/186 were low (1/100). These 2 reasons probably account for the lack of reactivity in this sample and again support the need of technologies that mimic the physiologic expression of the antigens. However, despite only 2 of the 4 known autoantibodies were detected with the human cell microarray technology, this experiment proves that at least some disease-specific autoantibodies can be discovered with the technology with limited off-target hits.

In addition to the known reactivities, we were able to confirm (by CBA, ELISA, or both) 6 of the 9 reactivities that were identified in the autoantibody discovery experiments, supporting the ability of the human cell microarray technology to uncover novel autoantibodies with a relatively clean and restricted set of identified reactivities despite its high-throughput nature. The specificity and cleanliness of massive screening technologies

is crucial when aiming to identify pathogenic antibodies in rare autoimmune diseases.

After confirming the reactivities found, we tried to assess their relevance by analyzing their presence in a larger cohort of patients with CIDP-AN and controls. As explained before, reactivity against EPHA7 was considered unspecific because it was found in patients' sera and one control. Autoantibodies against ATP4A and ATP4B have been described previously in atrophic gastritis^{23,24} because this proton pump is present in the parietal cells of the gastric mucosa. In our work, 2 patients and 3 controls were positive for anti-ATP4A/4B antibodies, and IHC of the mouse stomach confirmed the reactivity against parietal cells. These findings supported that, despite being real autoantibodies and confirmed the reports of the gastroenterology literature, they are unrelated to CIDP. In addition, and maybe of relevance for the assessment of atrophic gastritis, our findings support the use of CBA with cotransfected ATP4A/4B to detect these antibodies in patients with atrophic gastritis and anti-parietal cell antibodies.

Antibodies targeting LIF have never been described before. LIF is a pleiotropic cytokine from the interleukin-6 family that acts on different cell types.³⁰ It exerts a broad range of functions on diverse organ systems by activating the JAK/STAT transcription pathway. Its role in both central and peripheral nervous systems has been studied,^{25,26,31} and it seems to be related with the demyelination-remyelinating process that is also central in CIDP pathophysiology. In our cohort, one patient with CIDP and one with AN had anti-LIF antibodies, demonstrated by 2 different techniques (ELISA and CBA), while none of the controls had these antibodies. Considering both the described functions and the apparent specificity of the antibodies, we decided to study extensively these 2 patients. Both anti-LIF+ patients showed the same pattern of staining in peripheral nerve tissue, suggesting binding to the

peripheral nerve myelin, which could be potentially due to the presence of LIF antibodies. However, determining whether anti-LIF antibodies were responsible for the anti-myelin reactivity in these 2 patients was not possible in our study because of technical limitations related to poor performance of commercially available anti-LIF antibodies. Moreover, one of the anti-LIF-positive patients was also positive for Caspr1, an antibody with pathogenic potential, supporting that the anti-LIF could be an epiphenomenon in that patient.³² Because of that, although anti-LIF antibodies are present only in our CIDP-AN cohort and not in controls, and positive patients have the same pattern of reactivity in nerve tissue, the role of anti-LIF antibodies in CIDP and their pathogenicity need to be further elucidated.

Finally, anti-interferon lambda reactivity was also confirmed. The type III interferon family, also known as the interferon lambda (IFNL) system, initiates the JAK/STAT transcription activation pathway.³³ Antibodies against interferons are widely described in the context of susceptibility to infections and autoimmunity.^{34,35} However, there is only one study published on anti-IFNL antibodies (associated with persistence of respiratory symptoms after COVID-19).³⁶ In our work, we found 2 patients with anti-IFNL3 antibodies that, interestingly, were the same ones that were positive for anti-LIF. IFNL and LIF proteins do not share a significant proportion of their sequences, suggesting that the antigenic epitope is not the same for both autoantibodies or does not relate to their primary peptide sequence. Both IFNL and LIF activate the JAK/STAT pathway, and this might be related to the fact that they appear together, probably as an epiphenomenon. However, these findings need further studies on larger cohorts of patients to be clarified.

One of the main limitations of our study at the time of screening was the number of samples we were able to screen in the discovery phase with the human cell microarray technology. The human cell microarray technology is optimized and marketed for drug and monoclonal antibody profiling (and not for autoantibody discovery). The cost of screening each single sample precluded the profiling of an entire cohort of patients with CIDP. So, although we selected patients to optimize antibody discovery success, we have likely left out other interesting cases and cannot assume that the antigenic reactivities of these 8 patients reflect those of the entire cohort. That same limitation was the reason behind our choice of screening IgG antibodies only, despite the fact that IgM autoantibodies are also frequently found in other autoimmune neuropathies. Furthermore, because the 8 samples screened in this first phase were chosen according to specific criteria (typical CIDP or reactivity against neural structures), there is a selection bias that certainly affects the generalization of the screening results.

Another limitation of the technique is that it uses fixed cells. This may influence the reactivity against certain proteins (as illustrated with the NF140/186-positive sample) but also against some proteins or protein complexes in which the glycosylated moiety or other post-translational modifications are

relevant for the reactivity. Indeed, our study starts with the assumption that the antigens yet to be discovered in CIDP are proteins and that the antibodies are of the IgG isotype. The existence of other chronic, demyelinating neuropathies in which antibodies of the IgM isotype targeting gangliosides or glycans are found might argue against this approach in CIDP.³⁷

Our study provides the proof of concept that the human cell microarray technology is useful as a novel autoantibody-screening technology that could be used in other autoimmune diseases, including neurologic ones. Despite potential CIDP-associated autoantibodies (anti-LIF and anti-IFNL) being identified, their clinical and pathogenic relevance in CIDP needs to be further elucidated.

Acknowledgment

The authors acknowledge the Department of Medicine at the Universitat Autònoma de Barcelona. The authors also thank all our patients for their support and collaboration. M. Caballero-Ávila, C. Lleixà, E. Pacual-Goñi, L. Martín-Aguilar, N. Vidal, C. Tejada-Illa, R. Collet-Vidiella, R. Rojas-García, E. Cortés-Vicente, J. Turon-Sans, E. Gallardo, M. Olivé, A. Vesperinas, A. Carbayo and L. Llansó are members of the European Reference Network for Neuromuscular Diseases.

Study Funding

This work was supported by UCB Pharma and by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Carlos III, Spain, under grant P122/00387.

Disclosure

M. Caballero-Ávila was supported by a personal Rio Hortega grant CM21/00101. L. Martín-Aguilar was supported by a personal Juan Rodés grant JR21/00060. E. Pascual-Goñi was supported by a personal grant from the GBS-CIDP foundation. A. Carbayo was supported by a personal Rio Hortega grant CM21/00057. L. Querol received research grants from Instituto de Salud Carlos III-Ministry of Economy and Innovation (Spain), CIBERER, Fundació La Marató, GBS-CIDP Foundation International, UCB, and Grifols; received speaker or expert testimony honoraria from CSL Behring, Novartis, Sanofi-Genzyme, Merck, Annexon, Alnylam, Biogen, Janssen, Lundbeck, ArgenX, UCB, LFB, Octapharma and Roche; serves at Clinical Trial Steering Committee for Sanofi-Genzyme and Roche and is Principal Investigator for UCB's CIDP01 trial. L. Querol was supported by a personal clinical intensification grant INT20/00080. J. Freeth and J. Soden were former employees for Retrogenix, a company that was acquired by Charles River. S. Dawson is a Charles River employee. All other authors report no disclosures relevant to the manuscript. Go to Neurology.org/NN for full disclosures.

Publication History

Received by *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* September 5, 2023. Accepted in final form January 19, 2024. Submitted and externally peer reviewed. The handling editor was Associate Editor Marinos C. Dalakas, MD, FAAN.

Appendix Authors

Name	Location	Contribution
Marta Caballero-Avila, MD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; analysis or interpretation of data
Cinta Lleixà, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Neuromuscular Diseases, Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; analysis or interpretation of data
Elba Pascual-Goñi, MD, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; analysis or interpretation of data
Lorena Martín-Aguilar, MD, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; analysis or interpretation of data
Núria Vidal-Fernandez, RN, MSc	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Clara Tejada-Illa, MSc	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Roger Collet-Vidriella, MD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
Ricardo Rojas-García, MD, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Neuromuscular Diseases, Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Elena Cortés-Vicente, MD, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Neuromuscular Diseases, Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Janina Turon-Sans, MD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Neuromuscular Diseases, Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Eduard Gallardo, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Neuromuscular Diseases, Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Montse Olivé, MD, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Neuromuscular Diseases, Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Ana Vesperinas, MD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
Álvaro Carbayo, MD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Laura Llansó, MD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Laura Martínez-Martínez, PhD	Department of Immunology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Anthony Shock, PhD	UCB Pharma, Slough, United Kingdom	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Louis Christodoulou	UCB Pharma, Slough, United Kingdom	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Benjamin Dizier	UCB Pharma, Slough, United Kingdom	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content
Jim Freeth	Retrogenix (Charles River's company), Chrinley, United Kingdom	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; analysis or interpretation of data
Jo Soden	Retrogenix (Charles River's company), Chrinley, United Kingdom	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; analysis or interpretation of data
Sarah Dawson	Retrogenix (Charles River's company), Chrinley, United Kingdom	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; analysis or interpretation of data
Luis Querol, MD, PhD	Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Neuromuscular Diseases, Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; study concept or design; analysis or interpretation of data

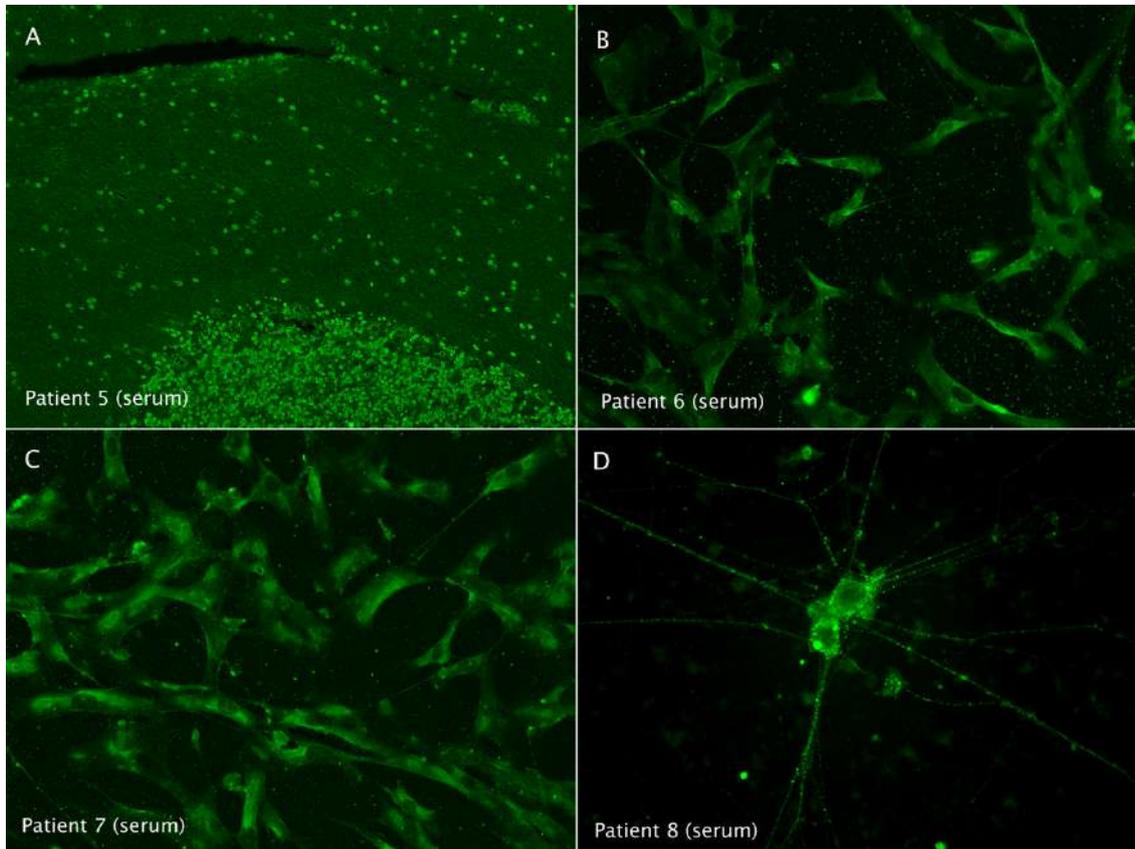
References

- Xiao ZX, Miller JS, Zheng SG. An updated advance of autoantibodies in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2021;20(2):102743. doi:10.1016/j.autrev.2020.102743
- Burbelo PD, O'Hanlon TP. New autoantibody detection technologies yield novel insights into autoimmune disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26(6):717-723. doi:10.1097/BOR.0000000000000107
- Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-García R, et al. Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*. 2013;73(3):370-380. doi:10.1002/ana.23794
- Delmont E, Manso C, Querol L, et al. Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain*. 2017;140(7):1851-1858. doi:10.1093/brain/awx124
- Prüss H. Autoantibodies in neurological disease. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(12):798-813. doi:10.1038/s41577-021-00543-w
- Li S, Song G, Bai Y, et al. Applications of protein microarrays in biomarker discovery for autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2021;12:645632. doi:10.3389/fimmu.2021.645632
- Leisgaard L, Ljungars A, Rimbault C, et al. Advances in antibody phage display technology. *Drug Discov Today*. 2022;27(8):2151-2169. doi:10.1016/j.drudis.2022.05.002
- Freeth J, Soden J. New advances in cell microarray technology to expand applications in target deconvolution and off-target screening. *SLAS Discov*. 2020;25(2):223-230. doi:10.1177/2472555219897567
- Quintana FJ, Pareiz ME, Izquierdo G, Lucas M, Cohen IR, Weiner HL. Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS. *Neurology*. 2012;78(8):532-539. doi:10.1212/WNL.0b013e3182478783
- Ayoglu B, Mitsios N, Kockum I, et al. Anoctamin 2 identified as an autoimmune target in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(8):2188-2193. doi:10.1073/pnas.1518553113
- Bunschoten C, Jacobs BC, Van den Bergh PYK, Comblath DR, van Doorn PA. Progress in diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Lancet Neurol*. 2019;18(8):784-794. doi:10.1016/S1474-4422(19)30144-9
- Dalakas MC, Madsen. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(9):507-517. doi:10.1038/nrneurol.2011.121
- Unciri A, Vallat JM. Autoimmune nodo-paranodopathies of peripheral nerve: the concept is gaining ground. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(6):627-635. doi:10.1136/jnnp-2017-317192
- Martín-Agular L, Lleixà C, Pascual-Goñi E. Autoimmune nodopathies, an emerging diagnostic category. *Curr Opin Neurol*. 2022;35(5):579-585. doi:10.1097/WCO.0000000000001107
- Miura Y, Devaux JJ, Fukami Y, et al. Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain*. 2015;138(Pt 6):1484-1491. doi:10.1093/brain/awv054
- Doppler K, Appelschauser L, Vilmann C, et al. Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain*. 2016;139(Pt 10):2617-2630. doi:10.1093/brain/aww189
- Pascual-Goñi E, Fehmi J, Lleixà C, et al. Antibodies to the Caspr/contactin-1 complex in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain*. 2021;144(4):1183-1196. doi:10.1093/brain/awab014
- Ogata H, Yamasaki R, Hiwataishi A, et al. Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2(10):960-971. doi:10.1002/acn3.248
- Devaux JJ, Miura Y, Fukami Y, et al. Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*. 2016;86(9):800-807. doi:10.1212/WNL.0000000000002418
- Querol L, Siles AM, Alba-Rovira R, et al. Antibodies against peripheral nerve antigens in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Sci Rep*. 2017;7(1):14411. doi:10.1038/s41598-017-14853-4
- Van den Bergh PYK, van Doorn PA, Hadden RDM, et al. European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint Task Force-Second revision. *J Peripher Nerv Syst*. 2021;26(3):242-268. doi:10.1111/jns.12455
- Taveggia C, Bolno A. DRG Neuron/Schwann cells myelinating cocultures. *Methods Mol Biol*. 2018;1791:115-129. doi:10.1007/978-1-4939-7862-5_9
- Lahner E, Brigatti C, Marzitto I, et al. Luminescent immunoprecipitation system (LIPS) for detection of autoantibodies against ATP4A and ATP4B subunits of gastric proton pump H⁺, K⁺-ATPase in atrophic body gastritis patients. *Clin Transl Gastroenterol*. 2017;8(1):e215. doi:10.1038/ctg.2016.71
- Lahner E, Marzitto I, Lampasona V, et al. Autoantibodies toward ATP4A and ATP4B subunits of gastric proton pump H⁺, K⁺-ATPase are reliable serological pre-endoscopic markers of corpus atrophic gastritis. *Clin Transl Gastroenterol*. 2020;11(10):e00240. doi:10.14309/ctg.0000000000000240
- Butzkueven H, Emery B, Cipriani T, Marriott MP, Kilpatrick TJ. Endogenous leukemia inhibitory factor production limits autoimmune demyelination and oligodendrocyte loss. *Glia*. 2006;53(7):696-703. doi:10.1002/glia.20321
- Chen Q, Liu Q, Zhang Y, Li S, Yi S. Leukemia inhibitory factor regulates Schwann cell proliferation and migration and affects peripheral nerve regeneration. *Cell Death Dis*. 2021;12(5):417. doi:10.1038/s41419-021-03706-8
- Lleixà C, Martín-Agular L, Pascual-Goñi E, et al. Autoantibody screening in Guillain-Barré syndrome. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):251. doi:10.1186/s12974-021-02301-0
- UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D480-D489. doi:10.1093/nar/gkaa1100

29. Rinaldi S, Halstead S, Lleixà C, et al. Inter-laboratory validation of nodal/paranodal antibody testing. *PNS 2022 Abstract Supplement J Peripher Nerv Syst.* 2022;27:S4-S183.
30. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(5):533-544. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.001
31. Qian T, Fan C, Liu Q, Yi S. Systemic functional enrichment and ceRNA network identification following peripheral nerve injury. *Mol Brain.* 2018;11(1):73. doi:10.1186/s13041-018-0421-4
32. Cortese A, Lombardi R, Briani C, et al. Antibodies to neurofascin, contactin-1, and contactin-associated protein 1 in CIDP: clinical relevance of IgG isotype. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020;7(1):e639. doi:10.1212/NXI.0000000000000639
33. Ye L, Schnepf D, Stacheli P. Interferon λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(10):614-625. doi:10.1038/s41577-019-0182-z
34. Mora-Arias T, Amezcua-Guerra LM. Type III interferons (lambda interferons) in rheumatic autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2020;68(1):1. doi:10.1007/s00005-019-00564-3
35. Calabrese LH, Winthrop K, Strand V, Yazdany J, Walter JE. Type I interferon, anti-interferon antibodies, and COVID-19. *Lancet Rheumatol.* 2021;3(4):e246-e247. doi:10.1016/S2665-9913(21)0034-5
36. Rojas M, Rodríguez Y, Acosta-Ampudia Y, et al. Autoimmunity is a hallmark of post-COVID syndrome. *J Transl Med.* 2022;20(1):129. doi:10.1186/s12967-022-03328-4
37. Querol L, Devaux J, Rojas-García R, Illa I. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(9):533-547. doi:10.1038/nrneuro.2017.84

Material suplementario.

Supplementary Figure 1. CIDP patients' reactivity against different neural tissue. Monkey cerebellum (A), human Schwann cell line (B,C) and rat dorsal root ganglion neurons (D), stained with patients serum in IgG (20).



Supplementary Table 1. List of candidate antigens evaluated by ELISA and/or cell-based assays.

Method	Antigen	c-DNA clone	Sera dilution	Coating	Blocking solution	Primary antibody-dilution	Secondary antibody - dilution
ELISA	EPHA7	11657-H08H, Sino Biological	1/50	5 µg/ml (in carbonate/bicarbonate buffer)	5% milk in PBS + 0.1% Tween-20		Rabbit anti-human IgG HRP (Agilent) – 1/3000
	LIF	ab287941, Abcam	1/100	3 µg/ml (in carbonate/bicarbonate buffer)			
	PIP	TP303135, Origene	1/100	5 µg/ml (in carbonate/bicarbonate buffer)			
	IFNL1	12339-HNAH, Sino Biological	1/100	1 µg/ml (in carbonate/bicarbonate buffer)			
	IFNL3	11890-H08H, Sino Biological	1/100	1 µg/ml (in carbonate/bicarbonate buffer)			
CBA	LIF	EX-G0101-M02, GeneCopoeia	1/50	Yes	Goat serum 5%	Anti-LIF 1/100 (MA5-23809, Invitrogen) – 1/100	Goat anti-rabbit AF488 and goat anti-human AF594 IgG – 1/500
				No			
	ATP4A/ATP4B	RC211772, Origene + RC206563, Origene		No		Anti-cmyc (Merck) – 1/200	Goat anti-mouse AF488 and goat anti-human AF594 IgG – 1/500
	NPR3	RC219453, Origene		No			
	TNFSF4	RC224021, Origene		No			

Supplementary Table 2. Clinical and laboratory features of anti-LIF positive patients.

	Anti-LIF patient I	Anti-LIF patient II
Sex	Female	Female
Age at onset	63 years	75 years
Initial diagnosis	Acute ataxic neuropathy	Typical CIDP
Clinical features		
Onset	Acute	Subacute
Weakness	Mild proximal weakness	Severe proximal weakness
Ataxia	Yes (severe)	Yes
Nodo/Paranodal antibodies	Negative	Anti-CASPR1 positive
CSF		
Proteins (g/L)	0.6	3.8
Cell count (cells/mm ³)	13	13
Treatments		
Steroids	Yes, good response	Yes, partial
IgEV	Yes, good response	Yes, partial
Others	No	Rituximab, good response

4.2. ARTÍCULO 2.

Long-Term Follow Up in Anti-Contactin-1 Autoimmune Nodopathy.

Caballero-Ávila M, Martín-Aguilar L, Pascual-Goñi E, Michael MR, Koel-Simmelink MJA, Höftberger R, Wanschitz J, Alonso-Jiménez A, Armangué T, Baars AE, Carbayo Á, Castek B, Collet-Vidiella R, De Winter J, Del Real MÁ, Delmont E, Diamanti L, Doneddu PE, Hiew FL, Gallardo E, Gonzalez A, Grinzinger S, Horga A, Iglseder S, Jacobs BC, Jauregui A, Killestein J, Pozza EL, Martínez-Martínez L, Nobile-Orazio E, Ortiz N, Pérez-Pérez H, Poppert KN, Ripellino P, Roche JC, Rodríguez de Rivera FJ, Rostasy K, Sparasci D, Tejada-Illa C, Teunissen CCE, Vegezzi E, Xuclà-Ferrarons T, Zach F, Wieske L, Eftimov F, Lleixà C, Querol L.

Ann Neurol. 2025 Mar;97(3):529-541. doi: 10.1002/ana.27142.

Long-Term Follow Up in Anti-Contactin-1 Autoimmune Nodopathy

Marta Caballero-Ávila ¹, Lorena Martín-Aguilar ¹, Elba Pascual-Goñi ¹,
 Milou R. Michael,² Marleen J.A. Koel-Simmelink,³ Romana Höftberger ⁴,
 Julia Wanschitz,⁵ Alicia Alonso-Jiménez,⁶ Thais Armangué ⁷, Adája Elisabeth Baars,⁸
 Álvaro Carbayo ¹, Barbara Cstek,⁹ Roger Collet-Vidiella,¹ Jonathan De Winter,⁶
 Maria Ángeles del Real,¹⁰ Emilien Delmont,¹¹ Luca Diamanti,¹²
 Pietro Emiliano Doneddu,¹³ Fu Liong Hiew,¹⁴ Eduard Gallardo,^{1,15} Amaia Gonzalez,¹⁶
 Susanne Grinzinger,¹⁷ Alejandro Horga,¹⁸ Stephan Iglseider,¹⁹ Bart C. Jacobs,⁸
 Amaia Jauregui,¹⁶ Joep Killestein,³ Elisabeth Lindeck Pozza,²⁰ Laura Martínez-Martínez,²¹
 Eduardo Nobile-Orazio,²² Nicolau Ortiz,²³ Helena Pérez-Pérez,²⁴ Kai-Nicolas Poppert,¹⁷
 Paolo Ripellino,²⁵ Jose Carlos Roche,²⁶ Francisco Javier Rodriguez de Rivera,²⁷
 Kevin Rostasy,²⁸ Davide Sparasci ²⁵, Clara Tejada-Illa,¹ Charlotte C.E. Teunissen,³
 Elisa Vegezzi,¹² Tomàs Xuclà-Ferraron,²⁹ Fabian Zach,³⁰ Luuk Wieske,² Filip Eftimov,²
 Cinta Lleixà ^{1,15} and Luis Querol ^{1,15}

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.27142

Received Jun 21, 2024, and in revised form Oct 31, 2024. Accepted for publication Nov 4, 2024.

Address correspondence to Dr Luis Querol, Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Sant Quinti 77, 08041, Barcelona, Spain. E-mail: lquerol@santpau.cat

Cinta Lleixà and Luis Querol contributed equally.

From the ¹Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Pau Biomedical Research Institute (IB Sant Pau), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Neurology, Amsterdam UMC location University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands; ³Neurochemistry Laboratory and Biobank, Department of Clinical Chemistry, Amsterdam UMC, Amsterdam, the Netherlands; ⁴Division of Neuropathology and Neurochemistry, Department of Neurology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria; ⁵Department of Neurology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria; ⁶Department of Neurology, Antwerp University Hospital, University of Antwerp, Antwerp, Belgium; ⁷Neuroimmunology program, IDIBAPS-Hospital de Clinic, University of Barcelona. Pediatric Neuroimmunology Program, Neurology Department, Sant Joan de Deu Children's Hospital, Barcelona, Spain; ⁸Department of Neurology, Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, the Netherlands; ⁹Department of Neurology, Landeskrankenhaus Villach, Villach, Austria; ¹⁰Department of Neurology, General University Hospital of Ciudad Real, Ciudad Real, Spain; ¹¹Referral Centre for Neuromuscular Diseases and ALS, Hospital La Timone, Marseille, France; ¹²IRCCS Mondino Foundation, Pavia, Italy; ¹³Neuromuscular and Neuroimmunology Unit, IRCCS Humanitas Research Hospital, Rozzano, Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Milan, Italy; ¹⁴Department of Neurology, Sunway Medical Center, Bandar Sunway, Malaysia; ¹⁵Neuromuscular Diseases, Centro para la Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; ¹⁶Department of Neurology, University Hospital Cruces, Barakaldo, Spain; ¹⁷Department of Neurology, Christian-Doppler Klinik, Salzburg, Austria; ¹⁸Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, University Hospital San Carlos, Madrid, Spain; ¹⁹Department of Neurology, Krankenhaus Barmherzige Brüder, Linz, Austria; ²⁰Department of Neurology, Klinik Favoriten, Vienna, Austria; ²¹Department of Immunology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Pau Biomedical Research Institute (IB Sant Pau), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²²Neuromuscular and Neuroimmunology Unit, IRCCS Humanitas Research Hospital, Rozzano, Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Milan University, Milan, Italy; ²³Department of Neurology, University Hospital Sant Joan, Reus, Spain; ²⁴Department of Neurology, University Hospital of Canarias, Tenerife, Spain; ²⁵Department of Neurology, Neurocenter of Southern Switzerland EOC, Faculty of Biomedical Sciences, Università della Svizzera Italiana, Lugano, Switzerland; ²⁶Department of Neurology, University Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain; ²⁷Department of Neurology, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, University Hospital La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ²⁸Department of Pediatric Neurology, Children's Hospital Datteln, Witten/Herdecke University, Datteln, Germany; ²⁹Department of Neurology, Hospital Sant Joan Despi Moisès Broggi, Sant Joan Despi, Spain; and ³⁰Department of Neurology, Kardinal Schwarzenberg Klinikum, Salzburg, Austria

Objective: To analyze long-term clinical and biomarker features of anti-contactin-1 (CNTN1) autoimmune nodopathy (AN).

Methods: Patients with anti-CNTN1⁺ autoimmune nodopathy detected in our laboratory from which clinical information was available were included. Clinical features and treatment response were retrospectively collected. Autoantibody, serum neurofilament light chain (sNfL), and serum CNTN1 levels (sCNTN1) were analyzed at baseline and follow up.

Results: A total of 31 patients were included. Patients presented with progressive sensory motor neuropathy (76.7%) with proximal (74.2%) and distal involvement (87.1%), ataxia (71.4%), and severe disability (median INCAT at nadir of 8). A total of 11 patients (35%) showed kidney involvement. Most patients (97%) received intravenous immunoglobulin, but only 1 achieved remission with intravenous immunoglobulin. A total of 22 patients (71%) received corticosteroids, and 3 of them (14%) did not need further treatments. Rituximab was effective in 21 of 22 patients (95.5%), with most of them (72%) receiving a single course. Four patients (12.9%) relapsed after a median follow up of 25 months after effective treatment (12–48 months). Anti-CNTN1 titers correlated with clinical scales at sampling and were negative after treatment in all patients, but 1 (20/21). sNfL levels were significantly higher and sCNTN1 significantly lower in anti-CNTN1⁺ patients than in healthy controls (sNfL: 135.9 pg/ml vs 7.48 pg/ml, sCNTN1: 25.03 pg/ml vs 22.186 pg/ml, $p < 0.0001$). Both sNfL and sCNTN1 returned to normal levels after successful treatment.

Interpretation: Patients with anti-CNTN1⁺ autoimmune nodopathy have a characteristic clinical profile. Clinical and immunological relapses are infrequent after successful treatment, suggesting that continuous treatment is unnecessary. Anti-CNTN1 antibodies, sNfL, and sCNTN1 levels are useful to monitor disease status in these patients.

ANN NEUROL 2025;97:529–541

Autoimmune nodopathies (AN) are a group of immune-mediated neuropathies associated with antibodies against cell adhesion molecules of the node of Ranvier.^{1,2} These antibodies target proteins, such as contactin 1 (CNTN1),³ contactin-associated protein 1,^{4,5} neurofascin 155 (NF155),^{6,7} or pan-neurofascin.^{8,9} They account for 5–10% of patients fulfilling diagnostic criteria of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP).¹⁰ However, they have recently been classified as a different diagnostic category in the recent update of the European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society CIDP diagnostic guidelines¹¹ due to their specific clinical, pathological, and response to treatment profiles, that differ from those of CIDP.

CNTN1 is an axonal protein present in the paranodal region, where it forms a heterodimer with contactin-associated protein 1 that binds to NF155 in the Schwann cell side of the paranode. This complex forms septate-like axoglial junctions, also known as transverse bands, that connect the paranodal loops of the Schwann cells to the axon.^{12,13} Autoantibodies against CNTN1 have been described in patients with rapidly progressive sensory motor neuropathy with predominant distal weakness and sensory ataxia; and poor response to intravenous immunoglobulins (IVIg).^{3,14,15} These antibodies have also been associated with membranous glomerulonephritis (MGN), that can appear concomitant to the neuropathy or isolated.^{16,17} Small case series suggest that rituximab is effective in anti-CNTN1⁺ AN patients,¹⁸ but data on long-term follow up and biomarker dynamics that help disease monitoring are lacking.

In the present study, we describe the clinical phenotype, long-term follow up, and response to treatment of the

largest cohort of anti-CNTN1⁺ AN patients so far. We also report data on autoantibody, serum neurofilament light chain (sNfL), and serum CNTN1 (sCNTN1) levels that support the use of these biomarkers in the follow up of anti-CNTN1⁺ AN patients.

Methods

Patients and Samples

We included all patients with anti-CNTN1 antibodies identified during routine clinical testing of nodal/paranodal antibodies from which clinical information was available. The samples were obtained between April 2002 and February 2024. These patients were selected for further characterization between May 2023 and February 2024. Demographic and clinical data were recorded in a coded database. This study was conducted according to a protocol approved by the Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (code IIBSP-NAI-2022-88). All patients gave written informed consent to participate in the study.

Clinical and demographic data were retrospectively collected by chart review by treating neurologists. Information about ancillary tests (neurophysiological studies, lumbar puncture, and nerve biopsy) was collected when available. Disability scores, including the modified Rankin Scale (mRS; 0–6),¹⁹ the Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT; 0–10),²⁰ and the inflammatory Rasch-built Overall Disability Scale (iRODS; 0–48) were collected at nadir and at follow up when available (at 1 month, 3 months, 6 months, and last follow up). Response to therapy was defined as a good response,

partial response, or no response, as classified by their primary neurologists depending on the routine clinical practice of each center (22 centers). Most centers (13/21, 62%) defined good response as a substantial improvement in functionality, or based on clinical scales (7/21, 33%), especially INCAT (≥ 1 point). A total of 11 centers (52%) defined partial response as an improvement of neurological examination, but not in functionality, 8 centers defined partial response as an improvement in clinical scales without reaching the good response definition, 1 center defined partial response based on neurological examination, and 1 center based on subjective improvement of the patients. Relapse was defined as clinical worsening after effective treatment. Remission was defined as absence of relapse (clinical or immunological) after effective treatment.

Serum samples were obtained at diverse time points during routine autoantibody testing and stored at -80°C until needed.

Anti-CNTN1 Antibody Detection and Titration

Antibodies against CNTN1 were analyzed by both fixed and live cell-based assay (CBA). A mammalian expression vector encoding full-length human CNTN1 cDNA (EX-A1153-M02; GeneCopoeia, Rockville, MD, USA) was transfected into HEK293 cells using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

In fixed CBA, cells were then fixed with paraformaldehyde 4% and blocked with rabbit serum 1/40 in phosphate-buffered saline. Double immunocytochemistry was performed using 1/100 diluted sera or 1/10 diluted cerebrospinal fluid (CSF), followed by anti-CNTN1 antibody at 1/1,000 (AF904; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and then secondary antibodies at 1/500 (rabbit anti-goat AF488 and rabbit anti-human AF594). Finally, slides were mounted with Fluoromount (Sigma, ST. Louis, MO, USA) and examined by two independent observers. Images were obtained with an Olympus BX51 Fluorescence Microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

In live CBA, sera diluted in 1/100 in cell culture medium were incubated with CNTN1-transfected HEK293 cells for 1 h at 37°C . Then, cells were fixed with paraformaldehyde 4% and blocked with rabbit serum 1/40 in phosphate-buffered saline. Primary and secondary antibodies were then incubated as in fixed CBA.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used as a confirmatory technique, and for titration and isotype identification. Maxisorb 96-well ELISA plates (Thermo Fisher Scientific, NUNC, Roskilde, Denmark) were coated overnight with $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ human recombinant CNTN1 protein (Sino Biological, Beijing, China). Wells were blocked with 5% non-fat milk in phosphate-buffered

saline 0.1% Tween 20 for 1 h, incubated with sera diluted 1/100 for 1 h, and then incubated with peroxidase conjugated rabbit anti-human immunoglobulin G (IgG) secondary antibody or IgG subtypes (Invitrogen) for 1 h at room temperature. ELISA was developed with tetramethylbenzidine solution (BioLegend, San Diego, CA, USA), and the reaction was stopped with 25% sulfuric acid. Optical density was measured at 450 nm in a Multiscan ELISA reader. Samples were considered positive by ELISA when they had a change in optical density higher than the average healthy control change in optical density plus 2 standard deviations. To calculate the antibody titers, the ELISA was performed with different serum concentrations (range 1/100–1/24,300).

sNfL Levels Detection

sNfL levels were measured in all available anti-CNTN1⁺ AN samples at onset and follow up, and compared with 60 aged-matched healthy controls (HC) and 111 Guillain-Barré syndrome (GBS) using the Simoa NF-light kit in the SR-X Immunoassay Simoa analyzer (Quanterix, Boston, MA, USA), as previously described.²¹ The samples were analyzed in duplicates following the manufacturer's instructions and standard procedures. All sNfL values were within the linear ranges of the assay. The intra-assay and interassay coefficients of variation at the intermediate level were 12.6 and 5.2%. sNfL percentiles and z-scores were calculated using the sNfL Reference App for both the adult and children populations.^{22,23} A z-score cutoff of 1.5 was considered relevant based on data published on multiple sclerosis.²²

sCNTN1 Levels

sCNTN1 levels were measured in all available anti-CNTN1⁺ AN samples at onset and follow up, and compared with 74 HC. sCNTN1 levels were measured at the Neurochemistry Laboratory at Amsterdam UMC using the Human Magnetic Luminex Assay (LXSAHM; R&D Systems) on the Bio-Plex 200 system (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, the Netherlands) according to the manufacturer's instructions, as previously described.²⁴ The intra-assay coefficient of variation was 1.9%, and none of the measurements had an intraassay coefficient of variation $>15\%$.

Statistical Analysis

Descriptive statistics are shown as the mean ($\pm\text{SD}$) or median [interquartile range] in continuous variables, and as frequencies (percentage) in categorical variables. Differences in sNfL, sCNTN1 levels and clinical scales between groups were analyzed with the *t* test or the Mann-Whitney *U* test when appropriate. Correlations between anti-CNTN1 antibody titers or sNfL and clinical scales

were assessed using the Spearman coefficient. The Kruskal–Wallis test was used to compare sNfL levels across groups based on anti-CNTN1 antibody titers. Statistical significance for all analyses was set at 0.05 (2-sided). All statistical analysis and graphs were done with SPSS version 26 (IBM, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism v9 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

Results

Anti-CNTN1 Antibody Screening

A total of 32 patients positive for anti-CNTN1 antibodies from 2002 to 2023 were identified. However, positivity could not be confirmed in 1 patient, resulting in 31 anti-CNTN1⁺ patients included in the study. All serum samples were positive in fixed and live CNTN1 CBA, except 1 that was only positive in live CBA (Figure S1). In 10 patients, only the initial sample was available; samples at different time points were available in 21 (11 patients with 2 samples, three patients with 3, 3 patients with 4, 1 patient with 6, 1 patient with 9). CSF was available in 3 patients.

Baseline Clinical Features

Mean age at disease onset was 50.3 years and 24 patients (77.4%) were men. Initial diagnosis was GBS in 16 (51.6%) patients, CIDP in 12 (38.7%), and others in 3 (sensory neuropathy, lumbosacral radiculopathy, and diabetic neuropathy). Three patients (9.7%) were children (aged 2, 3, and 10 years old). The most common form of presentation was sensory motor (23/30, 76.7%), with 5 patients that presented with a sensory-ataxic form (16.7%), and 2 with a pure motor form (6.7%). Most patients had symmetrical (23/29, 79.3%) weakness. Distal weakness was present in 27 patients (87.1%; upper limbs: 24/31, 77.4%; lower limbs: 23/31 74.2%), and 23 patients (74.2%) had proximal weakness (upper limbs: 15/31, 48.4%; lower limbs: 23/31 74.2%). Most patients had sensory deficit in the lower limbs (28/31, 93.5%), and 23 in the upper limbs (74.2%). Ataxia was frequent (20/28, 71.4%), being severe (walking aids needed) in 13 patients (46.4%); and 7 patients (24.1%) had tremor. Facial weakness was the most common cranial involvement (8/31, 25.8%), and respiratory involvement was rare (2/31, 6.5%).

Lumbar puncture was performed in 30 patients and revealed a median protein level in CSF of 2.4 g/L [1.4–5.8]. Nerve biopsy (sural) was obtained in 5 patients (3 axonal neuropathy, 1 demyelinating neuropathy, 1 normal).

Neurophysiological studies (n = 20) demonstrated clear demyelinating features, with motor distal latency

prolongation and nerve conduction slowing in most patients (18/20, 90%). All patients had sensory abnormalities. Decreased CMAP amplitudes were also present in a high number of patients (14/20, 70%). Needle electromyography was available in 14 patients, and half of them (7/14) had spontaneous activity. Motor nerve conduction studies are summarized in Table S1.

A total of 11 patients (35.5%) had a renal disease. Five patients (16.1%) were diagnosed with MGN during or after neuropathy onset; 1 of them had proteinuria before neuropathy onset. Three patients had nephrotic range proteinuria (but a kidney biopsy was not carried out). Three additional patients had a previous kidney involvement of unknown cause (2 chronic kidney disease and 1 post-renal acute failure).

Further information on clinical features is detailed in Table 1.

Clinical Response to Treatment and Follow Up

Patients received a median of 3 [2–4] treatments during follow up. Data on patients' treatment and response are summarized in Table 2. All patients except 1 received IVIg (97%), 22 patients received corticosteroids (71.0%), and 15 patients (48.4%) were treated with plasma exchange (PLEX), with a median 5 sessions [4, 5]. A total of 22 patients (71.0%) were treated with rituximab. Cyclophosphamide was used in 4 patients (12.9%), cyclosporine in 1 patient (3.2%), and azathioprine in 1 patient (3.2%).

Six patients had good response to IVIg (20%), and 13 (43.3%) partial response. Only 1 patient with good response to IVIG (3.3%) did not need additional therapies. All other patients required treatment with corticosteroids and/or rituximab due to neuropathy worsening. Response to corticosteroids was good in 8 patients (36.7%) and partial in 6 patients (27.2%). Three (13.6%) of the patients that responded to corticosteroids did not need additional therapies. Two (6.5%) received IVIg combined with corticosteroids to achieve neuropathy remission, and it was not possible to assign the response to any of them. Three patients needed rituximab as a second-line therapy, despite showing good initial response to corticosteroids. The most common corticosteroid regimens were oral prednisone 1 mg/kg/day (10/22, 45.4%) and oral or intravenous methylprednisolone pulses (10/22, 45.4%).

Rituximab was effective in 16 patients (16/22, 72.7%), and partially effective in 5 (5/22, 22.7%). One patient's response to rituximab is pending evaluation due to recent administration. However, antibody titers have become negative and sNfL have decreased significantly in this patient. The most common infusion protocol was 2 doses of 1,000 mg (13/22, 59.1%); 16 (16/22, 72.7%) patients

Table 1. Baseline Demographic and Clinical Data of Anti-Contactin-1 Autoimmune Nodopathy Patients (n = 31)

Sex (M), n (%)	24 (77.4%)	Sensory deficits upper limbs, n (%)	
		Superficial sensation	21 (67.7%)
		Vibration	16 (51.6%)
Age at onset, years (mean ± SD)	50.3 ± 22.4	Sensory deficits lower limbs, n (%)	
		Superficial sensation	26 (83.9%)
		Vibration	24 (77.4%)
Age at diagnosis, years (mean ± SD)	51.2 ± 22	Tremor, n (%)	7 (24.1%)
Previous cardiovascular risk factors, n (%)		Pain, n (%)	12 (40%)
Hypertension	12 (38.7%)		
Diabetes mellitus	3 (9.7%)		
Dyslipidemia	8 (25.8%)		
Other autoimmune diseases, n (%)	6 (19.4%)	Ataxia, n (%)	
		Mild (tandem not possible)	3 (10.7%)
		Moderate (ataxic gait but independent)	4 (14.3%)
		Severe (walking aids needed)	13 (46.4%)
Initial diagnosis, n (%)		Cranial involvement, n (%)	
Guillain-Barré syndrome	16 (51.6%)	Bilateral facial palsy	8 (25.8%)
CIDP	12 (38.7%)	Ophthalmoparesis	2 (6.5%)
Others	3 (9.7%)	Dysphagia	1 (3.2%)
Clinical course, n (%)		Renal involvement, n (%)	11 (35%)
Relapsing-remitting	9 (29%)	Membranous glomerulonephritis	5 (16%)
Progressive	22 (71%)		
Time to nadir, n (%)		Respiratory involvement	2 (6.9%)
Acute (<1 month)	6 (19.4%)		
Subacute (1–2 months)	6 (19.4%)		
Chronic (>2 months)	19 (61.3%)		
Clinical presentation, n (%)		Clinical scales at diagnosis, median [IQR]	
Sensory motor	23 (76.7%)	mRS (n = 20)	4 [3–5]
Pure sensory/ataxic	5 (16.7%)	INCAT (n = 21)	5 [3–9]
Pure motor	2 (6.7%)	RODS (n = 11)	19 [4–23]
Weakness upper limbs, n (%)		Clinical scales at nadir, median [IQR]	
Proximal and distal	15 (48.4%)	mRS (n = 26)	4 [4–5]
Proximal	0 (0%)	INCAT (n = 21)	8 [5–9]
Distal	9 (29%)	RODS (n = 13)	10 [5–21]
Weakness lower limbs, n (%)		Clinical scales at last follow up, median [IQR]	
Proximal and distal	17 (54.8%)	mRS (n = 20)	2 [1–3]
Proximal	6 (19.4%)	INCAT (n = 19)	3 [0–5]
Distal	6 (19.4%)	RODS (n = 7)	47 [35–48]

Abbreviations: INCAT = Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment; IQR = interquartile range; mRS = modified Rankin Scale; RODS = Rasch-built Overall Disability Scale.

received a single course of treatment, whereas 2 patients received 2 courses, and 3 patients every 6 months. Nine patients were not treated with rituximab. The reasons for not treating with rituximab were: 6 patients with good response to corticosteroids and/or IVIg, 2 patients died before starting rituximab, and the reason in 1 is unknown.

The response to cyclophosphamide in 4 patients was: 2 patients with no response, 1 had a good initial response to the first cycle, but did not respond in subsequent cycles, and the last patient was treated with rituximab concomitant to cyclophosphamide, so its role on the neuropathy improvement is unknown. No

Table 2. Treatment and Clinical Response of Anti-Contactin-1 Autoimmune Nodopathy Patients (n = 31)

	No. patients, n (%)	Response, n (%)	Dose/protocol, n (%)
IVIg	30 (97%)	Yes: 6, 20% Partial: 13, 43.3% No: 11, 36.7%	2 g/kg per course (monthly) 1 course: 12, 40% 2 courses: 7, 23.3% 3 courses: 4, 13.3% >3 courses: 5, 16.7% Unknown: 2, 0.7%
PLEX	15 (48.4%)	Yes: 5, 33.3% Partial: 8, 53.3% No: 2, 13.3%	No. sessions, median [IQR]: 5 [4–5]
Corticosteroids	22 (71%)	Yes: 8, 36.4% Partial: 6, 27.3% No: 8, 36.4%	MP pulses: 10, 45.4% Oral (mg/kg): 10, 45.4% Others: 3, 13.6%
Rituximab	22 (71%)	Yes: 16, 72.7% Partial: 5, 22.7% No: 0	1 + 1: 13, 59% 4: 2, 9% 4 + 2: 1, 4.5% Others: 6, 27.3%
Last effective treatment			
IVIg	1, 3.2%		
IVIg + corticosteroids	2, 6.5%		
Corticosteroids	3, 9.7%		
Rituximab	21, 67.7%		
No effective treatment	3, 9.7%		

Abbreviations: IVIg, intravenous immunoglobulins; PLEX, plasma exchange; 1 + 1: 1 g doses separated by 2 weeks; 4: 375 mg/m² every week for 4 consecutive weeks; 4 + 2: 375 mg/m² every week for four consecutive weeks, and then monthly for the next 2 months.

response was seen in the patient treated with cyclosporine, and response to azathioprine is unknown.

Clinical scales at diagnosis, nadir, and last follow up are summarized in Table 1. The worst scores on clinical scales (mRS, INCAT, and RODS) were detected at nadir (Table 1), with significant improvement during follow up (mRS, INCAT, and RODS at nadir vs last follow up, $p < 0.0001$; Fig 1). The median follow-up time was 35 months [18–76 months] from onset, and 25 months [12–48 months] from effective treatment (Fig 2). Four patients (12.9%) experienced a clinical relapse after effective treatment: 1 patient treated with corticosteroids, and 3 with rituximab. The first 1 was retreated with corticosteroids and achieved remission. In rituximab-treated patients, relapse appeared after a median time from infusion of 18 months [16–55 months]. Two of them were retreated with rituximab with good response, and the other 1 with rituximab and cyclophosphamide with no response. Finally, another patient worsened 2 months after starting rituximab (and needed adding corticosteroids), but was not considered a relapse,

because it had been a short time since the start of rituximab. Four (12.9%) patients died during follow up: 2 because of the neuropathy, 1 of pneumonia, and another of a disseminated neoplasm.

Finally, nephropathy outcomes were available in 7 patients. Five patients (4 rituximab, 1 IVIg + corticosteroids) improved their kidney function and/or proteinuria in parallel to neuropathy improvement. In the remaining 2 patients (treated with rituximab), renal function stabilized with treatment, as soon as the neuropathy started to improve. Interestingly, 2 of the patients with concomitant nephropathy and neuropathy relapsed after rituximab. Both patients had an initial good response of the renal parameters to rituximab, and worsened again with the relapse of the neuropathy.

Immunological Characteristics

Anti-CNTN1 CBA positivity was confirmed in all patients by ELISA. Titers of anti-CNTN1 antibodies at first sample ranged from 1/900 to >1/24,300. Autoantibodies were

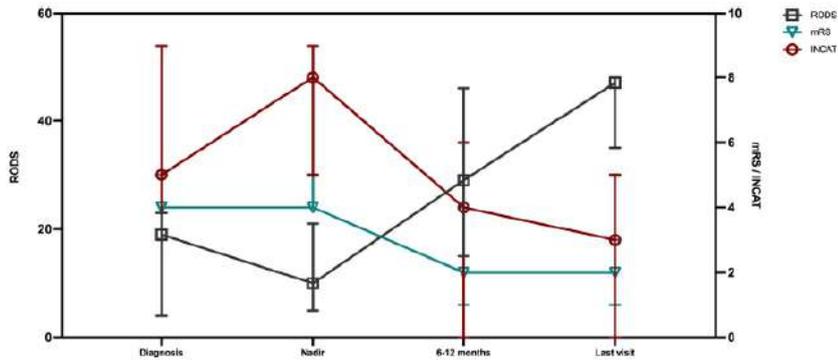


Figure 1: Clinical scales of anti-contactin-1-positive autoimmune nodopathy patients at onset and follow up. Patients in which clinical scales were available at diagnosis, nadir, 6–12 months, and last visit were: 26, 26, 17, and 20 for modified Rankin Scale (mRS); 21, 21, 15, and 19 for Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT); and 11, 13, 9, and 7 for Rasch-built Overall Disability Scale (RODS). The circle represents the median value, and the whiskers indicate the interquartile range. [Color figure can be viewed at www.annalsofneurology.org]

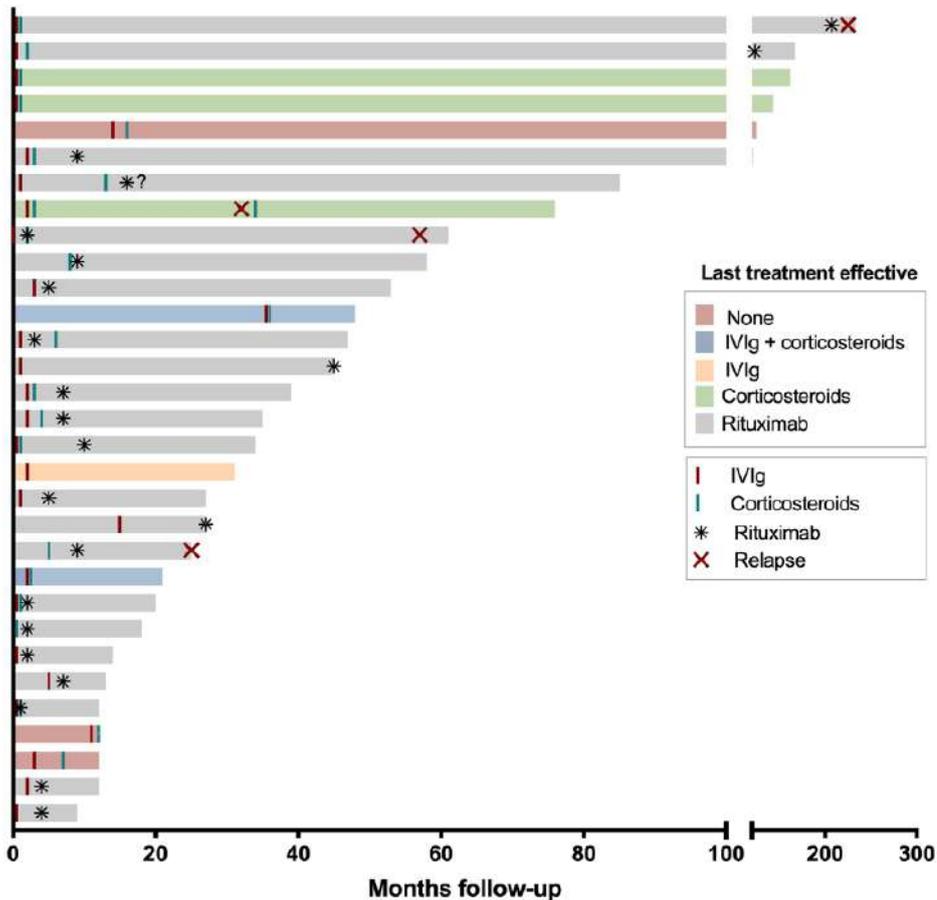


Figure 2: Follow-up of all anti-contactin-1-positive patients ($n = 31$). Patients are represented individually from onset to last follow up. Treatment with intravenous immunoglobulins (IVIg), corticosteroids, rituximab, and relapses are indicated as expressed in the legend. Bar color indicates the last effective treatment. Exact date of infusion of rituximab in 1 patient is missing (expressed as a question mark).

predominantly of the IgG4 subclass in all patients, but 1 (IgG1 only). All patients ($n = 21$) were negative for anti-CNTN1 antibodies after treatment, except for 1 patient with high anti-CNTN1 titers ($>1/24,300$) tested 6 months after rituximab that remained positive at significantly lower titers (1/900). All patients that presented with a clinical relapse after rituximab were positive at the moment of relapse for anti-CNTN1 antibodies. Finally, we were able to study the presence of anti-CNTN1 antibodies in CSF from 3 patients by fixed CBA and ELISA, with only 1 patient testing positive.

sNfL

sNfL levels of anti-CNTN1⁺ AN patients were analyzed in samples available at onset ($n = 28$) and at last follow up ($n = 21$); in 111 GBS patients and 60 HC (Fig 3A). Additionally, sNfL levels were also analyzed in other moments of the disease in 10 patients to analyze the kinetics ($n = 19$). sNfL levels correlated with age in HC ($r = 0.72$, $p < 0.001$), but not in patients with anti-CNTN1⁺ AN ($r = 0.29$, $p = 0.13$). sNfL levels were significantly higher at onset compared with last follow up (135.9 pg/ml vs 9.59 pg/ml, $p < 0.0001$) and with HC (7.48 pg/ml, $p < 0.0001$). sNfL levels at onset were also significantly higher compared with GBS patients (48.04 pg/ml, $p = 0.004$). No differences were found between sNfL in anti-CNTN1⁺ AN patients at last follow up and HC ($p = 0.6$). Regarding the z-score, all patients before treatment had a z-score >1.5 , with normalization after treatment (z-score <1.5) in 17 of 21 patients (81%; Fig 3B). Four patients remained with a z-score >1.5 after treatment; however, 2 of them started with significantly higher z-scores (1.5-fold), and in 1 of them the onset sample was missing.

sCNTN1 Levels

sCNTN1 levels were analyzed in 21 anti-CNTN1⁺ AN patients (13 patients with samples at onset and follow up, 3 patients only at onset, and 5 patients only at last follow up), and in 74 HC. Age was not taken into consideration, as sCNTN1 is not associated with age.²⁴ Median sCNTN1 at onset was 25.03 pg/ml [7.6–180.6 pg/ml], and was significantly lower compared with samples at last follow up (median 21,801 pg/ml [2,930–36,779], $p = 0.0003$) and HCs (median 22,186 pg/ml [19,729–24,735], $p < 0.0001$; Fig 4). No differences were found between samples at last follow up and HC ($p = 0.85$), suggesting that patients after treatment achieve normal levels of sCNTN1. Five follow-up samples had low levels of sCNTN1 ($<10,000$ pg/ml). These follow-up samples were collected a median of 7 months^{2–8} after onset, a significantly earlier follow-up sample than the patients with sCNTN1 increase (median 27.5 months [10.5–74.6], $p = 0.01$).

Relationship Between Biomarkers and Clinical Status

During follow up, all patients tested after treatment, but 1 (1/21), were negative for anti-CNTN1 antibodies. sNfL decreased in all patients tested after treatment ($n = 21$), achieving normal levels at last follow up. Median anti-CNTN1 titers, sNfL, and sCNTN1 at different follow-up time points available are summarized in Figure 5.

Absolute anti-CNTN1 titers at different points of the disease correlated with mRS ($n = 38$, $r = 0.61$, $p < 0.0001$), INCAT ($n = 43$, $r = 0.58$, $p = 0.0002$), and sNfL ($n = 61$, $r = 0.71$, $p < 0.0001$) at sampling, and negatively correlated with RODS also at sampling ($n = 20$, $r = -0.48$, $p = 0.03$; Fig 6). sNfL also correlated with INCAT ($n = 38$, $r = 0.64$, $p < 0.0001$), and

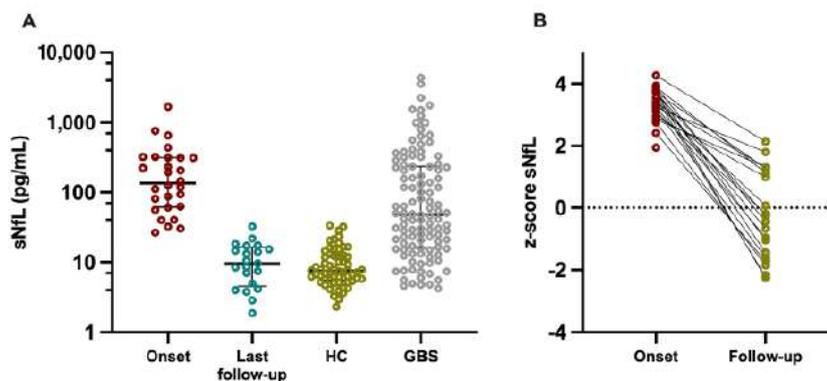


Figure 3: Patients with anti-contactin-1-positive autoimmune neuropathy had significantly higher serum neurofilament light chain (sNfL) at onset compared to last follow-up, healthy controls (HC), and Guillain-Barré syndrome (GBS) patients. (A) Raw values, the line in the center represents the median value, and the whiskers indicate the interquartile range; (B) z-scores. [Color figure can be viewed at www.annalsofneurology.org]

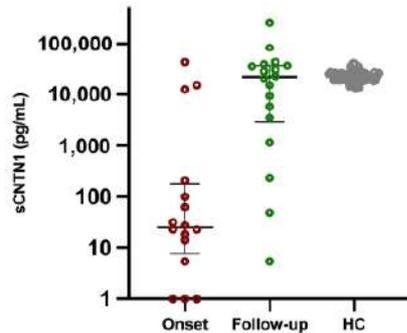


Figure 4: Serum contactin-1 (sCNTN1) levels. Patients with anti-CNTN1⁺ autoimmune nodopathy at onset had significantly lower levels of sCNTN1 levels compared with last follow up and healthy controls (HC). The line in the center represents the median value, and the whiskers indicate the interquartile range. [Color figure can be viewed at www.annalsofneurology.org]

negatively with RODS ($n = 22$, $r = -0.49$, $p = 0.02$) at sampling, but not with mRS. sCNTN1 levels correlated negatively with mRS at sampling ($n = 35$, $r = -0.42$, $p = 0.01$), and negatively with sNFL ($n = 30$, $r = -0.66$, $p < 0.0001$). However, we did not find any correlation between antibody titers, sNFL, or sCNTN1 levels at onset, with disability at last clinical evaluation.

Discussion

The present study describes the clinical and biomarker features of the largest anti-CNTN1⁺ AN cohort so far, and supports that patients with anti-CNTN1 antibodies have a clinical phenotype that includes sensory motor neuropathy, proximal and distal involvement, and severe ataxia, combined with very high CSF protein levels and poor

response to IVIg. Acute onset and demyelinating features in the neurophysiological studies were also frequent. Renal involvement was present in one-third of the patients, highlighting the importance of studying the presence of nephropathy in these patients. Our data support the utility of rituximab to achieve disease remission in this disorder, even after a single rituximab course, and reveal a low relapse rate, suggesting that continuous treatment might not be necessary in most patients once remission is achieved. Finally, anti-CNTN1 antibody titers, sNFL levels, and sCNTN1 levels are useful to monitor response to treatment and disease activity, and may help in therapeutic decision making in the follow up.

Anti-CNTN1⁺ AN is a very rare, but relevant, autoimmune neuropathy. As such, only small cohorts and case series of patients with this condition have been published in past years,^{14,15,25} and patients' features and therapeutic regimens are based on limited information, particularly in the long term. In the first description, anti-CNTN1⁺ AN patients were reported to be older than CIDP patients.³ The median age in our cohort was similar to that of other CIDP cohorts,²⁶ and 10% of our patients were children. Information about pediatric AN is scarce, with a single cohort of children with inflammatory neuropathies that showed the prevalence of antibodies to nodal/paranodal proteins can be similar to the adult population.²⁷ Initially, it seemed that pediatric anti-CNTN1 could be less aggressive, as in the first case published,²⁸ rituximab was not needed to achieve remission. However, the 2 other pediatric patients included in our study received rituximab, suggesting that anti-CNTN1⁺ children may behave similar to adult cases. We have not found relevant associations with other medical conditions, including diabetes mellitus,

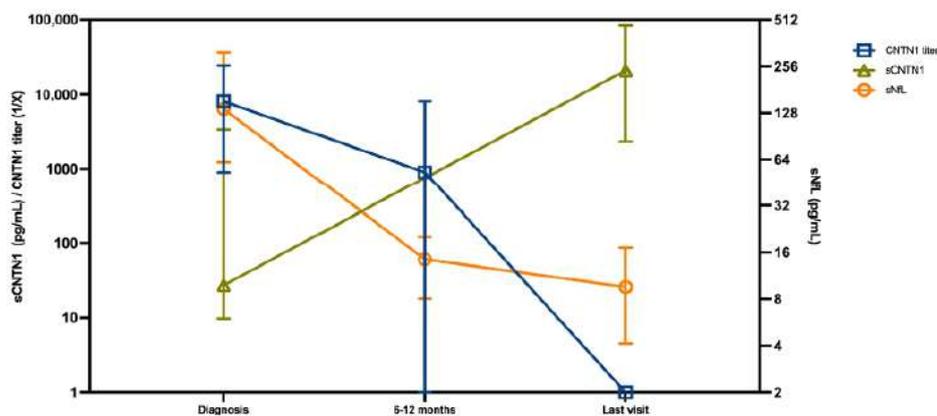


Figure 5: Biomarkers' kinetics of anti-contactin-1-positive (CNTN1⁺) autoimmune nodopathy patients at onset and follow-up. Samples available for serum neurofilament light chain (sNFL) were 28 at diagnosis, 14 at 6–12 months, and 15 at last visit; for CNTN1 titer were 27 at diagnosis, 14 at 6–12 months, and 15 at last visit; and for sCNTN1 were 17 at diagnosis and at last follow up. The circle represents the median value, and the whiskers indicate the interquartile range. [Color figure can be viewed at www.annalsofneurology.org]

reports³⁵ or small series of patients¹⁸ describing the beneficial effect of rituximab in anti-CNTN1⁺ AN patients have been previously published. A major contribution of the present study is that most anti-CNTN1⁺ AN patients in which rituximab was administered only needed 1 course to achieve long-lasting remission. Long-lasting response after a single course of rituximab has also been described in other IgG4-related diseases, such as MuSK myasthenia³⁶ or pemphigus.³⁷ The reason why when CD20⁺ B-cells are repopulated, the pathogenic antibodies do not appear again is unknown. Even if other therapies (corticosteroids, cyclophosphamide etc.) can also be useful, we suggest that rituximab should be considered as an early therapeutic option (or even as first-line treatment) for this disorder, as a single course could be enough to maximize disease control, minimizing side-effects, treatment burden, and costs.

Anti-CNTN1 antibodies are pathogenic according to *in vitro* and *in vivo* studies.^{16,38–40} We hypothesized that antibody levels should correlate with clinical status. The relationship between clinical status and antibody titers is well known in some other IgG4 neurological diseases,^{7,8,36} but data on anti-CNTN1 antibodies do not exist. Importantly for monitoring purposes, the present study supports that IgG4 anti-CNTN1 antibodies disappear in remission and re-appear again in relapses and, thus, antibody titers could be used to monitor disease activity and guide the need for further treatment. Because of that, we suggest that testing anti-CNTN1 antibodies during follow up would be useful to detect which patients need close clinical monitoring.

Furthermore, the present study also demonstrates that patients with anti-CNTN1⁺ AN have high levels of sNfL compared with HC, and even with GBS patients at onset. sNfL levels are associated with disease severity and axonal variants, and have an independent prognostic value in GBS patients,^{21,41} suggesting that they could also be useful to detect axonal damage in autoimmune neuropathies. sNfL levels have been studied in anti-NF155 patients⁷ and pan-neurofascin,⁸ and have also been associated with disease activity. All patients included in the present cohort showed elevated sNfL levels at onset when compared with normal levels stratified by age, and in most of them returned to normal levels on successful treatment. This drop in sNfL was accompanied by clinical improvement in all cases, demonstrating that sNfL can also be used to monitor disease activity and the need for treatment escalation. Finally, unlike GBS, we have not found that baseline sNfL levels are associated with poorer prognoses at last follow up. This may be due to factors other than axonal damage, such as treatment choices or diagnostic delay that may also influence long-term disability. Nonetheless, the number of patients included in our

cohort was not sufficient to demonstrate long-term prognostic value of sNfL, as it happens in GBS.

CNTN1 is a secreted protein that remains attached to the axonal membrane through glycosylphosphatidylinositol anchors in the myelinated nerves, but CNTN1 can also be found in plasma in a soluble form.⁴² As CNTN1 is also expressed in myelinating fibers of the central nervous system, it was initially studied as a soluble biomarker in multiple sclerosis, demonstrating its prognostic value.^{43,44} Later, it was demonstrated that AN patients had markedly lower levels of sCNTN1 when compared with CIDP patients, with anti-CNTN1 AN patients being the subgroup with the lowest levels of sCNTN1.²⁴ Although the logical hypothesis of this reduction was that anti-CNTN1 antibodies cleared sCNTN1, it was unclear, because other AN, such as anti-NF155, also had low levels of sCNTN1, so this reduction could be related to other inherent factors of the disease. We now confirm that sCNTN1 levels are extremely low in CNTN1⁺ AN patients at onset, and return to normal levels after treatment, suggesting that the drop in the antibody titers plays a role on the reappearance of sCNTN1 in the anti-CNTN1 AN subgroup (not in the rest of AN). However, the return to normal levels of sCNTN1 seems slower than with sNfL so, although sCNTN1 might also be a good biomarker to monitor disease activity, its comparative advantage with sNfL is unclear.

The main limitation of the present study was the small number of patients and its retrospective nature, including the retrospective analysis of treatment efficacy using chart review. More frequent follow-up visits using solid clinimetrics and sampling is necessary to better understand the rate of improvement in these severely disabled patients, and the dynamics of anti-CNTN1 antibodies, sNfL, and sCNTN1 to assess their usability as biomarkers of disease activity. Despite that, anti-CNTN1 AN is an extremely rare disorder and, with 31 patients, our cohort provided useful information on clinical, biomarker, and treatment response features that will inform the neuromuscular community on how to treat these patients more efficiently.

In conclusion, the present study supports that, first, anti-CNTN1 AN patients represent a distinct subset of autoimmune neuropathies with poor response to IVIg, and excellent and long-lasting response to rituximab; second, that clinical and immunological relapses are rare in this disorder; and third, that antibody titers, sNfL, and sCNTN1 might be useful biomarkers to monitor disease activity.

Acknowledgments

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), instituto de Carlos III, Spain, under grant

PI22/00387. M. Caballero-Ávila was supported by a personal Rio Hortega grant CM21/00101. L. Martín-Aguilar was supported by a personal Juan Rodés grant JR21/00060. E. Pascual-Goñi was supported by the Benson Fellowship grant from the GBS-CIDP foundation. A. Carbayo was supported by a personal Rio Hortega grant CM21/00057. R. Collet-Vidiella was supported by a personal Rio Hortega grant CM23/00002. Luis Querol was supported by a personal clinical intensification INT23/00066. The authors acknowledge the Department of Medicine at the Universitat Autònoma de Barcelona. The authors also thank all our patients for their support and collaboration. Several authors of this publication are members of the European Reference Network for rare neuromuscular diseases (EURO-NMD).

Author Contributions

M.C.A. contributed to drafting the text or preparing the figures; L.M.A., E.P.G., M.M., M.K., R.H., J.W., A.A.K., T.A., A.E.B., A.C., B.C., R.C.V., J.W., A.R., E.D., L.D., P.E.D., F.L.H., W.G., A.G., S.G., A.H., S.I., B.J., A.J., J.K., E.L.P., L.M.M., E.N.O., N.O., H.P.P., K.N.P., P.E., J.C.R., F.R.R., K.R., D.S., C.T.I., C.T., E.V., T.X.F., F.Z., L.W., and F.E. contributed to the acquisition and analysis of data. L.Q. and C.L. contributed to the conception and design of the study.

Potential Conflicts of Interest

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau receives payment for autoimmune nodopathies antibody testing. The Medical University of Vienna (Austria; employer of RH) receives payment for antibody assays and for antibody validation experiments organized by Euroimmun (Lübeck, Germany). All other authors have nothing to report.

Data Availability

Anonymized data not published within this article will be made available by request from any qualified investigator.

References

- Martín-Aguilar L, Lleixà C, Pascual-Goñi E. Autoimmune nodopathies, an emerging diagnostic category. *Curr Opin Neurol* 2022;35:579-585. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000001107>.
- Uncini A, Vallat JM. Autoimmune nodo-paranodopathies of peripheral nerve: the concept is gaining ground. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89:627-635. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317192>.
- Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-García R, et al. Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 2013;73:370-380. <https://doi.org/10.1002/ana.23794>.
- Doppler K, Appeltshauer L, Villmann C, et al. Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain* 2016;139:2617-2630. <https://doi.org/10.1093/brain/aww189>.
- Pascual-Goñi E, Fehmi J, Lleixà C, et al. Antibodies to the Caspr/contactin-1 complex in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain* 2021;144:1183-1196. <https://doi.org/10.1093/brain/awab014>.
- Devaux JJ, Miura Y, Fukami Y, et al. Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2016;86:800-807. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002418>.
- Martín-Aguilar L, Lleixà C, Pascual-Goñi E, et al. Clinical and laboratory features in anti-NF155 autoimmune Nodopathy. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021;9:e1098. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001098>.
- Appeltshauer L, Junghof H, Messinger J, et al. Anti-pan-neurofascin antibodies induce subclass-related complement activation and nodoparanodal damage. *Brain* 2023;146:1932-1949. <https://doi.org/10.1093/brain/awac418>.
- Delmont E, Manso C, Querol L, et al. Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 2017;140:1851-1858. <https://doi.org/10.1093/brain/awx124>.
- Querol L, Devaux J, Rojas-García R, Illa I. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Neurol* 2017;13:533-547. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.84>.
- Van den Bergh PYK, van Doorn PA, Hadden RDM, et al. European academy of neurology/peripheral nerve society guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force-second revision. *J Peripher Nerv Syst* 2021;26:242-268. <https://doi.org/10.1111/jns.12455>.
- Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, et al. Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron* 2001;30:385-397. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00296-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00296-3).
- Salzer JL, Brophy PJ, Peles E. Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia* 2008;56:1532-1540.
- Miura Y, Devaux JJ, Fukami Y, et al. Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain* 2015;138:1484-1491. <https://doi.org/10.1093/brain/aw054>.
- Dubey D, Honorat JA, Shelly S, et al. Contactin-1 autoimmunity: serologic, neurologic, and pathologic correlates. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 2020;7:e771. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000771>.
- Doppler K, Appeltshauer L, Wilhelmi K, et al. Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86:720-728. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-309916>.
- Fehmi J, Davies AJ, Antonelou M, et al. Contactin-1 links autoimmune neuropathy and membranous glomerulonephritis. *PLoS One* 2023;18:e0281156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281156>.
- Querol L, Rojas-García R, Diaz-Manera J, et al. Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;2:e149. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000149>.
- Kasner SE. Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol* 2006;5:603-612. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70495-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70495-1).
- Allen JA, Merkies ISJ, Lewis RA. Monitoring clinical course and treatment response in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy during routine care: a review of clinical and laboratory assessment measures. *JAMA Neurol* 2020;77:1159-1166. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.0781>.

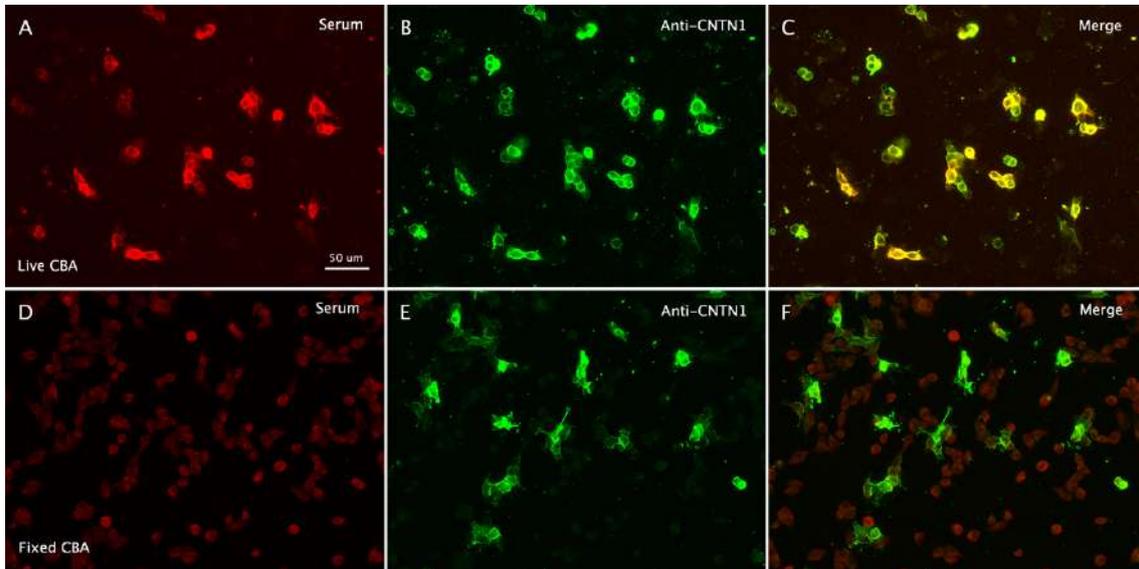
21. Martín-Aguilar L, Camps-Renom P, Lleixà C, et al. Serum neurofilament light chain predicts long-term prognosis in Guillain-Barré syndrome patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2020;5:70-77. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323899>.
22. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol* 2022;21:246-257. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00009-6).
23. Abdelhak A, Petermeier F, Benkert P, et al. Serum neurofilament light chain reference database for individual application in paediatric care: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol* 2023;22:826-833. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00210-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00210-7).
24. Wieske L, Martín-Aguilar L, Fehmi J, et al. Serum Contactin-1 in CDP: a cross-sectional study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021;8:e1040. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001040>.
25. Xu Q, Liu S, Zhang P, et al. Characteristics of anti-Contactin1 antibody-associated autoimmune Nodopathies with concomitant membranous nephropathy. *Front Immunol* 2021;12:759187. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.759187>.
26. Siles AM, Martínez-Hernández E, Araque J, et al. Antibodies against cell adhesion molecules and neural structures in paraneoplastic neuropathies. *Ann Clin Transl Neurol* 2018;5:559-569. <https://doi.org/10.1002/actn.3.554>.
27. De Simoni D, Ricken G, Winklehner M, et al. Antibodies to nodal/paranodal proteins in paediatric immune-mediated neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2020;7:e763. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000763>.
28. Carrera-García L, Natera-de Benito D, Lleixà C, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with contactin-1 antibodies in a child. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2019;6:e602. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000602>.
29. Appeltshauer L, Messinger J, Starz K, et al. Diabetes mellitus is a possible risk factor for Nodo-paranodopathy with Antiparanodal autoantibodies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2022;9:e1163. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001163>.
30. Van Doorn PA, Van den Bergh PYK, Hadden RDM, et al. European academy of neurology/peripheral nerve society guideline on diagnosis and treatment of Guillain-Barré syndrome. *Eur J Neurol* 2023;30:3646-3674. <https://doi.org/10.1111/ene.16073>.
31. Hashimoto Y, Ogata H, Yamasaki R, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with concurrent membranous nephropathy: an anti-paranode and podocyte protein antibody study and literature survey. *Front Neurol* 2018;9:997. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00997>.
32. Taieb G, Le Quintrec M, Pialot A, et al. "neuro-renal syndrome" related to anti-contactin-1 antibodies. *Muscle Nerve* 2019;59:E19-E21. <https://doi.org/10.1002/mus.26392>.
33. Delmont E, Brodovitch A, Kouton L, et al. Antibodies against the node of Ranvier: a real-life evaluation of incidence, clinical features and response to treatment based on a prospective analysis of 1500 sera. *J Neurol* 2020;267:3664-3672. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10041-z>.
34. Papantoniou M, Tsatinas KV, Papageorgiou E, et al. Corticosteroid responsive anti-contactin-1 antibody seropositive chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: report of two cases. *Acta Neurol Belg* 2024;124:1089-1091. <https://doi.org/10.1007/s13760-023-02463-z>.
35. Hou Y, Zhang C, Yu X, et al. Effect of low-dose rituximab treatment on autoimmune nodopathy with anti-contactin 1 antibody. *Front Immunol* 2022;26:939062. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.939062>.
36. Marino M, Basile U, Spagni G, et al. Long-lasting rituximab-induced reduction of specific-but not Total-IgG4 in MuSK-positive myasthenia gravis. *Front Immunol* 2020;11:613. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00613>.
37. Joly P, Mouquet H, Roujeau JC, et al. A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus. *N Engl J Med* 2007;357:545-552. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067752>.
38. Labasque M, Hvert B, Nogales-Gadea G, et al. Specific contactin N-glycans are implicated in neurofascin binding and autoimmune targeting in peripheral neuropathies. *J Biol Chem* 2014;289:7907-7918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.528489>.
39. Koike H, Kadoya M, Kaide KI, et al. Paranodal dissection in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017;88:465-473. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-314895>.
40. Taieb G, Jentzer A, Vegezzi E, et al. Effect of monovalency on anti-contactin-1 IgG4. *Front Immunol* 2023;14:1021513. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1021513>.
41. van Tilburg SJ, Teunissen CE, Maas CCHM, et al. Dynamics and prognostic value of serum neurofilament light chain in Guillain-Barré syndrome. *EBioMedicine* 2024;102:105072. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105072>.
42. Durbec P, Gennarini G, Goridis C, Rougon G. A soluble form of the F3 neuronal cell adhesion molecule promotes neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1992;117:877-887. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.4.877>.
43. van Lierop ZY, Wieske L, Koel-Simmeling MJ, et al. Serum contactin-1 as a biomarker of long-term disease progression in natalizumab-treated multiple sclerosis. *Mult Scler* 2022;28:102-110. <https://doi.org/10.1177/13524585211010097>.
44. van Lierop ZY, Noteboom S, Steenwijk MD, et al. Neurofilament-light and contactin-1 association with long-term brain atrophy in natalizumab-treated relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2022;28:2231-2242. <https://doi.org/10.1177/13524585221118676>.

Material suplementario.

Supplementary Table 1. Motor conduction studies of first electrophysiological available in anti-CNTN1 AN patients (n=20).

	Distal latency (mS)	Amplitude (mV)	Velocity (m/s)
Ulnar			<i>Wrist- Below elbow</i>
Normal values	≤3.3	≥5.0	≥48
Patients results, mean ± SD			
Right (n=15)	8.1 ± 8.1	3.8 ± 3.1	30.9 ± 15.6
Left (n=6)	6.4 ± 3.1	3.4 ± 3.4	31 ± 13.9
Median			<i>Wrist- Elbow</i>
Normal values	≤3.9	≥6.0	≥50
Patients results, mean ± SD			
Right (n=17)	7.2 ± 2.5	5.1 ± 4	33.3 ± 16.6
Left (n=11)	7.7 ± 2.9	4.2 ± 2.1	34.1 ± 15.5
Peroneal			<i>Ankle- Knee</i>
Normal values	≤5.0	≥2.0	≥42
Patients results, mean ± SD			
Right (n=16)	8.2 ± 4.1	1.8 ± 2.8	35.5 ± 10.6
Left (n=14)	9.8 ± 4.4	1.9 ± 2.9	33.4 ± 9.1
Tibial			<i>Ankle- Knee</i>
Normal values	≤6.0	≥3.0	≥38
Patients results, mean ± SD			
Right (n=13)	7.6 ± 3.6	0.8 ± 0.9	35.3 ± 9.2
Left (n=13)	7.7 ± 3.6	1.2 ± 1.9	37 ± 9.2

Supplementary Figure 1. Live vs fixed CNTN1 CBA. Serum patient IgG staining (A,D) and commercial antibody against CNTN1 (B,E), in live (A,B,C) and fixed (D,E,F) CNTN1 CBA. One patient's serum binds to CNTN1- transfected HEK293 cells when incubating in live cells (A), and not in fixed cells (D).



5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

Las neuropatías inflamatorias son un grupo heterogéneo de enfermedades del SNP con diferentes mecanismos fisiopatológicos. Los autoanticuerpos juegan un papel importante en su fisiopatología. Sin embargo, solo se han identificado autoanticuerpos en un pequeño subgrupo de pacientes (como aquellos con autoanticuerpos dirigidos contra proteínas del nodo de Ranvier). Además, el conocimiento sobre los pacientes con los diferentes anticuerpos conocidos es limitado, dada la baja prevalencia de estas enfermedades. Por este motivo realizamos estos dos trabajos incluidos en esta tesis doctoral.

El **primer trabajo** tenía dos objetivos fundamentales. Por una parte, demostrar la utilidad de un microarray celular (Retrogenix, con expresión de más de 5000 proteínas en células HEK293) para detectar nuevos autoanticuerpos en suero de pacientes; y por otra, encontrar nuevos autoanticuerpos en pacientes con CIDP. Con los anteriores objetivos, se dividió el estudio en tres fases: una primera fase de validación, una segunda de descubrimiento, y finalmente una tercera de confirmación.

En la primera fase de validación, se analizó la reactividad del suero de cuatro pacientes con anticuerpos conocidos (1 anti-CNTN1, 1 anti-NF155, 1 anti-Caspr1 y 1 anti-NF140/186) contra el microarray celular, a fin de validar la técnica para su uso en la identificación de nuevas dianas antigénicas. Posteriormente en la fase de descubrimiento, se analizó la reactividad de suero de 8 pacientes con CIDP (4 con una CIDP típica, y 4 con reactividad conocida frente a tejidos nerviosos) para encontrar nuevos potenciales anticuerpos. Finalmente, con las reactividades encontradas en la fase anterior, se realizaron experimentos de confirmación de los nuevos autoanticuerpos (mediante ELISA y/o inmunocitoquímica de células transfectadas). Los autoanticuerpos confirmados, se estudiaron finalmente en una cohorte extensa de pacientes con CIDP o NoA (n=96) y controles (n=100), para dilucidar su relevancia clínica.

El microarray celular detectó los anticuerpos anti-CNTN1 y anti-NF155 correctamente. Sin embargo, el microarray no evidenció reactividad en los pacientes con anticuerpos anti-Caspr1 y anti-NF140/186. En la fase de descubrimiento, se detectaron un total de 9 reactividades en los 8 pacientes estudiados (2 pacientes sin reactividad, 4 pacientes con 1 sola, 1 paciente con 4 y 1 paciente con 6). De los potenciales autoanticuerpos se pudieron confirmar seis en los mismos sueros mediante inmunocitoquímica de células transfectadas

y/o ELISA. Los autoanticuerpos confirmados en los sueros de la fase de descubrimiento fueron: anti- ATP4A/4B, anti-EPHA7, anti-LIF, e anti-interferón lambda 1,2 y 3 (IFNL).

Finalmente, todos los anticuerpos confirmados fueron estudiados en las cohortes de confirmación (96 pacientes y 100 controles). De ellos, los anti-ATP4A/4B y los anti-EPHA7 se encontraron tanto en pacientes como en controles, por lo que no se consideraron relevantes en la CIDP. De hecho, los anti-ATP4A/4B se habían descrito previamente en pacientes con gastritis atrófica y anticuerpos anti-mucosa gástrica. Por este motivo, en nuestro trabajo analizamos la reactividad de los sueros positivos contra tejido gástrico, y se confirmó que todos los pacientes con anti-ATP4A/4B eran aquellos con anticuerpos contra células parietales gástricas.

Los anti-LIF y anti-IFNL 1,2,3 se encontraron en un paciente en la fase de descubrimiento y se confirmaron mediante ELISA y/o inmunocitoquímica. En el cribaje en la cohorte de confirmación, se encontraron ambos juntos en otro paciente (un paciente con una nodopatía autoinmune anti-Caspr1) y en ningún suero control (0/100). Dado que la proteína LIF (del inglés *leukemia inhibitor factor*) se conoce que tiene un papel importante en la mielinización, decidimos estudiar en profundidad estos dos pacientes. Se objetivó que ambos sueros anti-LIF+ presentaban un patrón de marcaje contra mielina en inmunohistoquímica de nervio periférico y en cocultivos de neuronas mielinizadas-células de Schwann.

Por otra parte, en el **segundo trabajo**, el objetivo era conocer en profundidad tanto las características clínicas como inmunológicas de los pacientes con nodopatía autoinmune anti-CNTN1. Se realizó un estudio retrospectivo donde se incluyeron pacientes con anticuerpos anti-CNTN1. Se recogieron datos clínicos, respuesta a diferentes tratamientos y seguimiento a largo plazo. Además, se recogieron muestras seriadas de estos pacientes de cara a estudiar el valor de los títulos de anticuerpos, así como biomarcadores de actividad como los sNfL y la sCNTN1. Los sNfL se midieron mediante SIMoA en todas las muestras disponibles y los niveles de sCNTN1 mediante Luminex.

Se incluyeron 31 pacientes con anticuerpos anti-CNTN1 identificados en la rutina asistencial. La edad media de inicio fue de 50,3 años, con predominio masculino (77,4%). La forma clínica más frecuente fue una neuropatía sensitivo-motora progresiva (76,7%), caracterizada por debilidad distal (87,1%) y proximal (74,2%), ataxia sensitiva (71,4%) y elevada discapacidad (mediana de las escalas clínicas al nadir: INCAT 8, mRS 4, RODS 10). Tal y como se había descrito previamente, aproximadamente un tercio de los pacientes

(11/31, 35%) presentó afectación renal, principalmente en forma de glomerulonefritis membranosa.

Respecto al tratamiento, el 97% de los pacientes recibió IgEV, aunque solo un 20% mostró una buena respuesta inicial. De los pacientes con buena respuesta inicial a las IgEV, solo un paciente presentó una respuesta sostenida sin necesidad de más tratamientos. Asimismo, los corticoides también fueron ampliamente usados (22/31 pacientes, 71%), logrando remisión clínica en 3 pacientes. Finalmente, el rituximab fue administrado en 22 pacientes (71%), con una tasa de respuesta favorable en todos los pacientes menos en uno (pendiente de respuesta en el momento del estudio) siendo suficiente un único ciclo en el 72% de los casos. Tras una mediana de seguimiento de 25 meses tras el tratamiento efectivo, solo el 12,9% presentó recaídas clínicas, todas ellas asociadas a la reaparición de autoanticuerpos anti-CNTN1.

En cuanto a los biomarcadores, los títulos de anticuerpos anti-CNTN1 se correlacionaron significativamente con la gravedad clínica evaluada mediante escalas como el mRS y el INCAT. Tras el tratamiento, los anticuerpos negativizaron en todos los casos salvo uno, en el que los títulos bajaron significativamente tras seis meses de tratamiento. Los niveles séricos de sNfL fueron significativamente más elevados en pacientes al inicio (mediana: 135.9 pg/ml) en comparación con controles sanos (mediana 7.48 pg/ml) y pacientes con SGB (mediana 48.04 pg/ml), normalizándose tras el tratamiento efectivo. Asimismo, los niveles séricos de sCNTN1 estaban significativamente disminuidos al inicio (mediana: 25.03 pg/ml), y se normalizaron progresivamente tras la remisión clínica (mediana: 22186 pg/ml).

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

En esta tesis se presentan dos estudios centrados en el estudio de autoanticuerpos en neuropatías autoinmunes. Por un lado, se describe una nueva técnica de descubrimiento de autoanticuerpos y se exponen posibles nuevos antígenos; y, por otro lado, se aumenta el conocimiento sobre los pacientes con NoA anti-CNTN1.

Muchos grupos de investigación han centrado sus estudios en la búsqueda de nuevos autoanticuerpos en CIDP. Una de las nuevas técnicas de cribaje descrita recientemente es el microarray celular, que consiste en la expresión de un gran número de proteínas en células humanas, de cara a presentarlas de la forma más fisiológica posible y así, estudiar sus interacciones con fluidos. Hasta el momento, esta técnica solo se había usado para el estudio de la reactividad de anticuerpos monoclonales, proteínas recombinantes u otros fármacos contra proteínas de membrana o secretadas.

El **primer trabajo** demuestra que el microarray celular (Retrogenix) es una tecnología útil para la identificación de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes raras como la CIDP. Es el primer trabajo publicado que plantea que esta técnica puede ser útil para el descubrimiento de anticuerpos en suero, ya que hasta ahora solo se había utilizado para detectar dianas de fármacos.

En primer lugar, la utilidad de esta técnica se evidencia con la detección de anticuerpos conocidos como la anti-NF155 y anti-CNTN1. Sin embargo, no se detectaron reactividades de sueros con anticuerpos anti-Caspr1 o anti-NF140/186, posiblemente debido a limitaciones de la técnica. Una de las limitaciones más importantes es la falta de coexpresión de complejos proteicos, como por ejemplo la coexpresión de CNTN1 y Caspr1, necesaria para la detección de parte de los anticuerpos anti-Caspr1.

En segundo lugar, en la fase de descubrimiento se detectaron nueve potenciales reactividades, seis de las cuales se pudieron confirmar mediante técnicas complementarias. De estas seis sólo los autoanticuerpos anti-LIF y anti-IFNL se encontraron exclusivamente y de forma conjunta en pacientes con neuropatías autoinmunes (1 CIDP y 1 NoA) y no en controles. El análisis detallado de los anticuerpos anti-LIF se realizó ya que la proteína LIF está implicada en procesos de desmielinización-remielinización. Este análisis reveló que ambos pacientes positivos presentaron un patrón de reactividad común contra la mielina del nervio periférico, aunque no se pudo establecer la contribución directa de estos

anticuerpos en esta reactividad ni en la fisiopatología de la enfermedad, debido a limitaciones técnicas.

Entre las limitaciones de este primer estudio destacan el reducido número de muestras analizadas en la fase de descubrimiento, la selección dirigida de muestras que podría sesgar los resultados, y el enfoque exclusivo en anticuerpos IgG, sin exploración de autoanticuerpos de otras clases como IgM, relevantes en neuropatías inflamatorias. Asimismo, el uso de células fijadas podría afectar la detección de autoanticuerpos frente a antígenos conformacionales o con modificaciones postraduccionales críticas.

El **segundo trabajo** de esta tesis describe características clínicas, evolución a largo plazo y dinámica de biomarcadores en la cohorte más larga hasta la fecha de pacientes con NoA anti-CNTN1. Los resultados confirman que estos pacientes presentan un fenotipo clínico característico, que incluye neuropatía sensitivo-motora grave con afectación proximal y distal, ataxia severa y niveles muy elevados de proteínas en LCR. La afectación renal aparece en aproximadamente en un tercio de estos pacientes, especialmente en forma de glomerulonefritis membranosa, evoluciona de manera paralela a la neuropatía, lo que refuerza la necesidad de realizar cribado de enfermedad renal en estos pacientes.

Desde el punto de vista terapéutico, la respuesta a IgEV y a corticoides es limitada. Aun así, existe un pequeño grupo de pacientes que logra remisión completa con corticoides, lo que hace pensar que pueden ser útiles en algunos pacientes. El tratamiento con rituximab es altamente eficaz, con remisión clínica sostenida en la mayoría de los casos tras un solo ciclo. Estos datos sugieren que los pacientes con anti-CNTN1 podrían beneficiarse de un tratamiento precoz con rituximab como estrategia de primera línea, minimizando así la carga terapéutica y los efectos secundarios asociados a terapias prolongadas. Nuestro estudio también apunta, que, tras la remisión clínica, la tasa de recaídas es baja (13%) por lo que el tratamiento mantenido podría ser innecesario.

Finalmente, en este trabajo también se estudió el papel de los biomarcadores serológicos en pacientes con anti-CNTN1. Se observó una correlación entre los títulos de anticuerpos anti-CNTN1 y la actividad clínica, ya que los pacientes negativizaban anticuerpos tras el tratamiento eficaz, y en los pocos pacientes que presentaron recaídas, volvían a reaparecer los anticuerpos. Los niveles sNfL (muy elevados) y de sCNTN1 (muy bajos) también se correlacionan con actividad clínica, volviendo a niveles normales tras el tratamiento eficaz.

A pesar de las limitaciones inherentes al diseño retrospectivo y al tamaño relativamente pequeño de la cohorte, el estudio aporta evidencia robusta sobre las características clínicas,

respuesta terapéutica y valor de biomarcadores en esta enfermedad rara. Estos hallazgos tienen implicaciones relevantes para el manejo clínico, sugiriendo que los anticuerpos anti-CNTN1, sNfL y sCNTN1 podrían guiar las decisiones terapéuticas y el seguimiento evolutivo en la práctica clínica.

En resumen, esta tesis valida una nueva técnica de detección de nuevos autoanticuerpos que puede ser utilizada en otras enfermedades autoinmunes. Se detectaron nuevos potenciales autoanticuerpos, pendientes de conocer su relevancia clínica. La detección de estos nuevos anticuerpos es esencial para la correcta caracterización de los pacientes, tal y como se demuestra en el segundo trabajo, donde describimos una cohorte de pacientes con anticuerpos anti-CNTN1. El segundo trabajo describe las características clínicas de estos pacientes, así como la respuesta a tratamiento y el seguimiento a largo plazo, que ayudará a mejorar la práctica clínica habitual.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- El microarray celular es una técnica novedosa útil para detectar anticuerpos conocidos e identificar nuevos autoanticuerpos en sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes como la CIDP.
- Los anticuerpos anti-LIF y anti-IFNL se han identificado en un subgrupo de pacientes con CIDP, sin embargo, su relevancia clínica y patogénica requiere de más estudios.
- Disponer de técnicas para conocer nuevos autoanticuerpos es indispensable de cara a poder identificar nuevos subgrupos de pacientes, como las neuropatías autoinmunes.
- Los pacientes con neuropatía autoinmune anti-CNTN1 tienen un fenotipo clínico característico, en forma de una neuropatía sensitivo-motora grave, ataxia y afectación renal.
- El tratamiento más eficaz en los pacientes con anti-CNTN1 es el rituximab, logrando remisión clínica en la mayoría de los casos tras un solo ciclo, así como baja tasa de recaídas.
- Los títulos de autoanticuerpos anti-CNTN1, los niveles de sNfL y de sCNTN1 son útiles para monitorizar la actividad clínica pacientes con anti-CNTN1.

8. LINIAS DE FUTURO

8. LINIAS DE FUTURO

En primer lugar, esta tesis doctoral demuestra la utilidad de un microarray celular para la detección de nuevos autoanticuerpos en suero. Esto abre la puerta a usar el microarray para descubrir nuevos anticuerpos y ampliar el número de muestras de pacientes analizadas. Dado que esta técnica se usa para el descubrimiento de IgG, sería de interés también ampliar la técnica a anticuerpos IgM, ya que son de gran importancia en el campo de las neuropatías autoinmunes.

En segundo lugar, se describen dos nuevos potenciales autoanticuerpos en neuropatías inflamatorias, los anti-LIF y los anti-INFL. De cara a estudiar su relevancia clínica y patológica, se analizará la presencia de estos anticuerpos en cohortes más extensas de CIDP y neuropatías autoinmunes, para encontrar nuevos pacientes y poder ampliar el conocimiento de estos anticuerpos.

Finalmente, esta tesis amplía el conocimiento de los pacientes con NoA anti-CNTN1. Dado que el estudio presentado se trata de un estudio retrospectivo, tiene sus limitaciones. En primer lugar, es necesario realizar un estudio prospectivo con recogida de escalas clínicas de forma sistémica, así como muestras de laboratorio. Esto nos permitirá, por una parte, evaluar de forma objetiva la respuesta a los diferentes tratamientos; y por otra, conocer correctamente la cinética de los anticuerpos anti-CNTN1, los sNfL y la CNTN1 soluble.

9. BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Wilkinson JL. Peripheral nervous system. In: Neuroanatomy for Medical Students. Elsevier; 1992. p. 32–51.
2. Marani E, Lakke EAJF. Peripheral Nervous System Topics. In: The Human Nervous System, Third Edition. Elsevier; 2012. p. 82–140.
3. Fehmi J, Scherer SS, Willison HJ, Rinaldi S. Nodes, paranodes and neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(1):61-71.
4. Querol L, Devaux J, Rojas-Garcia R, Illa I. Autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(9):533-547.
5. Feinberg K, Eshed-Eisenbach Y, Frechter S, Amor V, Salomon D, Sabanay H, et al. A Glial Signal Consisting of Gliomedin and NrCAM Clusters Axonal Na⁺ Channels during the Formation of Nodes of Ranvier. *Neuron*. 2010 Feb 25;65(4):490–502.
6. Salzer JL, Brophy PJ, Peles E. Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia*. 2008;56(14):1532–40.
7. Mary E.T. Boyle, Erik O. Berglund. Contactin Orchestrates Assembly of the Septate-like Junctions at the Paranode in Myelinated Peripheral Nerve. *Neuron*. 2001;30:385–97.
8. Traka M, Dupree JL, Popko B, Karagogeos D. The Neuronal Adhesion Protein TAG-1 Is Expressed by Schwann Cells and Oligodendrocytes and Is Localized to the Juxtaparanodal Region of Myelinated Fibers. *J Neurosci*. 2002;22(8):3016-3024
9. Kieseier BC, Hartung H-P, Wiendl H. Immune circuitry in the peripheral nervous system. *Curr Opin Neurol*. 2006 Oct;19(5):437–45.
10. Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Feb;84(2):208–12.
11. Richner M, Ferreira N, Dudele A, Jensen TS, Vaegter CB, Gonçalves NP. Functional and structural changes of the blood-nerve-barrier in diabetic neuropathy. *Front Neurosci*. 2018;12:1038.
12. Pollard JD, Westland KW, Harvey GK, Jung S, Bonner J, Spies JM, et al. Activated T cells of nonneural specificity open the blood-nerve barrier to circulating antibody. *Ann Neurol*. 1995 Apr;37(4):467–75.
13. Soliven B. Animal models of autoimmune neuropathy. *ILAR J*. 2014 Apr;54(3):282–90.
14. Kieseier BC, Mathey EK, Sommer C, Hartung HP. Immune-mediated neuropathies *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):31.
15. Meyer Zu Horste G, Heidenreich H, Lehmann HC, Ferrone S, Hartung H-P, Wiendl H, et al. Expression of antigen processing and presenting molecules by Schwann cells in inflammatory neuropathies. *Glia*. 2010 Jan 1;58(1):80–92.

16. Pollard JD, McCombe PA, Baverstock J, Gatenby PA, McLeod JG. Class II antigen expression and T lymphocyte subsets in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol*. 1986 Dec;13(2):123–34.
17. Pollard JD, Baverstock J, McLeod JG. Class II antigen expression and inflammatory cells in the guillain-barré syndrome: Antigen Expression and Inflammatory Cells in GBS. *Ann Neurol*. 1987 Apr;21(4):337–41.
18. Spies JM, Westland KW, Bonner JG, Pollard JD. Intraneural activated T cells cause focal breakdown of the blood-nerve barrier. *Brain*. 1995 Aug;118 (Pt 4):857–68.
19. Leppert D, Hughes P, Huber S, Erne B, Grygar C, Said G, et al. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology*. 1999 July 13;53(1):62–70.
20. Kieseier BC, Tani M, Mahad D, Oka N, Ho T, Woodroffe N, et al. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain*. 2002 Apr;125(Pt 4):823–34.
21. Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008 Oct;4(10):557–67.
22. Leonhard SE, Papri N, Querol L, Rinaldi S, Shahrizaila N, Jacobs BC. Guillain-Barré syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2024 Dec 19;10(1):97.
23. Nobile-Orazio E, Giannotta C, Musset L, Messina P, Léger JM. Sensitivity and predictive value of anti-GM1/galactocerebroside IgM antibodies in multifocal motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85(7):754–8.
24. Yoshikawa K, Kuwahara M, Morikawa M, Fukumoto Y, Yamana M, Yamagishi Y, et al. Varied antibody reactivities and clinical relevance in anti-GQ1b antibody-related diseases. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;5(6):e501.
25. Pascual-Goñi E, Caballero-Ávila M, Querol L. Antibodies in Autoimmune Neuropathies: What to Test, How to Test, Why to Test. *Neurology*. 2024;103(4):e209725
26. Martin NH. The immunoglobulins: a review. *J Clin Pathol*. 1969;22(2):117-131
27. Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969;63(1):78-85.
28. Dalakas MC. IgG4-Mediated Neurologic Autoimmunities: Understanding the Pathogenicity of IgG4, Ineffectiveness of IVIg, and Long-Lasting Benefits of Anti-B Cell Therapies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;9(1):e11116.
29. Kolfshoten MVDN, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martínez-Martínez P, Vermeulen E, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*. 2007 Sept 14;317(5844):1554–7.

30. Huijbers MG, Vergoossen DL, Fillié-Grijpma YE, et al. MuSK myasthenia gravis monoclonal antibodies: Valency dictates pathogenicity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2019;6(3):e547
31. B Burbelo PD, O'Hanlon TP. New autoantibody detection technologies yield novel insights into autoimmune disease. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(6):717-723.
32. Lleixà C, Titulaer M, Rohrbacher S, Mgbachi V, Halstead S, Fehmi J, et al. Inter-laboratory validation of nodal/paranodal antibody testing. *J Peripher Nerv Syst.* 2025 Mar;30(1):e70000.
33. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-linked immunosorbent assay: Types and applications. *Methods Mol Biol.* 2023;2612:1–17.
34. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Martinez-Hernandez E, Diaz-Manera J, Suárez-Calvet X, et al. Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol.* 2013 Mar;73(3):370–80.
35. Delmont E, Manso C, Querol L, Cortese A, Berardinelli A, Lozza A, et al. Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain.* 2017 July 1;140(7):1851–8.
36. Sundell GN, Tao S-C. Phage immunoprecipitation and sequencing—a versatile technique for mapping the antibody reactome. *Mol Cell Proteomics.* 2024 Sept;100831.
37. Leon KE, Schubert RD, Casas-Alba D, et al. Genomic and serologic characterization of enterovirus A71 brainstem encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020;7(3):e703
38. Mandel-Brehm C, Benson LA, Tran B, Kung AF, Mann SA, Vazquez SE, et al. ZSCAN1 Autoantibodies Are Associated with Pediatric Paraneoplastic ROHHAD. *Ann Neurol.* 2022 Aug 1;92(2):279–91.
39. Dubey D, Beecher G, Hammami MB, Knight AM, Liewluck T, Triplett J, et al. Identification of Caveolae-Associated Protein 4 Autoantibodies as a Biomarker of Immune-Mediated Rippling Muscle Disease in Adults. *JAMA Neurol.* 2022 Aug 1;79(8):808–16.
40. Atak A, Mukherjee S, Jain R, et al. Protein microarray applications: Autoantibody detection and posttranslational modification. *Proteomics.* 2016;16(19):2557-2569.
41. M McKeon A, Lesnick C, Vorasoot N, et al. Utility of Protein Microarrays for Detection of Classified and Novel Antibodies in Autoimmune Neurologic Disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2023;10(5):e200145
42. Quintana FJ, Farez MF, Izquierdo G, Lucas M, Cohen IR, Weiner HL. Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS. *Neurology.* 2012;78(8):532-539.
43. Querol L, Clark PL, Bailey MA, et al. Protein array-based profiling of CSF identifies RBPJ as an autoantigen in multiple sclerosis. *Neurology.* 2013;81(11):956-963.

44. Moritz CP, Tholance Y, Stoevesandt O, Ferraud K, Camdessanché JP, Antoine JC. CIDP Antibodies Target Junction Proteins and Identify Patient Subgroups: An Autoantigenomic Approach. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2021;8(2):e944.
45. Freeth J, Soden J. New Advances in Cell Microarray Technology to Expand Applications in Target Deconvolution and Off-Target Screening. *SLAS Discov*. 2020 Feb 1;25(2):223–30.
46. Finlay WJJ, Coleman JE, Edwards JS, Johnson KS. Anti-PD1 'SHR-1210' aberrantly targets pro-angiogenic receptors and this polyspecificity can be ablated by paratope refinement. *MAbs*. 2019 Jan 2;11(1):26–44.
47. Chang J, Peng H, Shaffer BC, Baskar S, Wecken IC, Cyr MG, et al. SiGleC-6 on chronic lymphocytic leukemia cells is a target for post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation antibodies. *Cancer Immunol Res*. 2018 Sept 1;6(9):1008–13.
48. roers MC, Bunschoten C, Nieboer D, Lingsma HF, Jacobs BC. Incidence and Prevalence of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. 2019;52(3-4):161-172.
49. Rajabally YA, Simpson BS, Beri S, Bankart J, Gosalakkal JA. Epidemiologic variability of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with different diagnostic criteria: Study of a UK population. *Muscle Nerve*. 2009 Apr;39(4):432–8.
50. Dalakas MC. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(9):507-517.
51. Dionne A, Nicolle MW, Hahn AF. Clinical and electrophysiological parameters distinguishing acute-onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy from acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve*. 2010 Feb;41(2):202–7.
52. Ruts L, Drenthen J, Jacobs BC, van Doorn PA; Dutch GBS Study Group. Distinguishing acute-onset CIDP from fluctuating Guillain-Barre syndrome: a prospective study. *Neurology*. 2010;74(21):1680-1686.
53. Doneddu PE, Cocito D, Manganelli F, Fazio R, Briani C, Filosto M, et al. Atypical CIDP: Diagnostic criteria, progression and treatment response. Data from the Italian CIDP Database. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 Feb 1;90(2):125–32.
54. Katz JS, Saperstein DS, Gronseth G, Amato AA, Barohn RJ. Distal acquired demyelinating symmetric neuropathy. *Neurology*. 2000 Feb 8;54(3):615–20
55. Vallat JM, Magy L, Ciron J, Corcia P, Le Masson G, Mathis S. Therapeutic options and management of polyneuropathy associated with anti-MAG antibodies. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(9):1111-1119.
56. Lewis RA, Sumner AJ, Brown MJ, Asbury AK. Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology*. 1982;32(9):958-964.
57. Thomas PK, Claus D, Jaspert A, et al. Focal upper limb demyelinating neuropathy. *Brain*. 1996;119 (Pt 3):765-774.

58. Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Yamada M, Hayashi Y, Tanaka Y, et al. Motor-dominant chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol*. 2010 Apr;257(4):621–9.
59. Mathey EK, Park SB, Hughes RA, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(9):973-985.
60. Van den Bergh PYK, van Doorn PA, Hadden RDM, Avau B, Vankrunkelsven P, Allen JA, et al. European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint Task Force—Second revision. *Eur J Neurol*. 2021 Nov 1;28(11):3556–83.
61. Hughes RAC, Bouche P, Cornblath DR, Evers E, Hadden RDM, Hahn A, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol*. 2006 Apr;13(4):326–32.
62. Van den Bergh PY, Hadden RD, Bouche P, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision. *Eur J Neurol*. 2010;17(3):356-363.
63. Allen JA, Lewis RA. CIDP diagnostic pitfalls and perception of treatment benefit. *Neurology*. 2015 Aug 11;85(6):498–504.
64. Rajabally YA. Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy: Current Therapeutic Approaches and Future Outlooks. *Immunotargets Ther*. 2024;13:99-110.
65. 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):765-775.
66. Yan WX, Archelos JJ, Hartung HP, Pollard JD. P0 protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol*. 2001;50(3):286–92.
67. Kwa MS, van Schaik IN, Brand A, Baas F, Vermeulen M. Investigation of serum response to PMP22, connexin 32 and P(0) in inflammatory neuropathies. *J Neuroimmunol*. 2001;116(2):220-225.
68. Inglis HR, Csurhes PA, McCombe PA. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(4):419–22.
69. Gabriel CM, Gregson NA, Hughes RA. Anti-PMP22 antibodies in patients with inflammatory neuropathy. *J Neuroimmunol*. 2000;104(2):139-146.

70. Querol L, Siles AM, Alba-Rovira R, et al. Antibodies against peripheral nerve antigens in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Sci Rep*. 2017;7(1):14411.
71. Fukami Y, Iijima M, Koike HH, Yagi S, Furukawa S, Mouri N, et al. Autoantibodies Against Dihydrolipoamide S-Acetyltransferase in Immune-Mediated Neuropathies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2024 Jan 5;11(2):e200199.
72. Jentzer A, El-Bechir J, Taieb G, Devaux JJ. Autoantibodies Against Dihydrolipoamide S-Acetyltransferase Are Not Associated With Immune-Mediated Neuropathies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2025 Jan 1;12(1):e200336.
73. Caballero-Ávila M, Martín-Aguilar L, Collet-Vidiella R, Querol L, Pascual-Goñi E. A pathophysiological and mechanistic review of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy therapy. *Front Immunol*. 2025 Apr 14;16:1575464.
74. Cocito D, Paolasso I, Antonini G, Benedetti L, Briani C, Comi C, et al. A nationwide retrospective analysis on the effect of immune therapies in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Eur J Neurol*. 2010 Feb;17(2):289–94.
75. Caballero-Ávila M, Pascual-Goñi E, Lleixà C, Martín-Aguilar L, Collet-Vidiella R, Querol L. The changing landscape of primary autoimmune neuropathies. *Nat Rev Neurol*. 2025;21(10):544-555.
76. Whittam DH, Tallantyre EC, Jolles S, Huda S, Moots RJ, Kim HJ, et al. Rituximab in neurological disease: Principles, evidence and practice. *Pract Neurol*. 2019;19(1):5–20.
77. Doneddu PE, Cocito D, Fazio R, et al. Prospective open-label trial with rituximab in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy not responding to conventional immune therapies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2024;95(9):838-844.
78. Du Y, Yan Q, Li C, Zhu W, Zhao C, Hao Y, et al. Efficacy and safety of combined low-dose rituximab regimen for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2025;12(1):180-191.
79. Nobile-Orazio E, Cocito D, Manganelli F, Fazio R, Lauria G, Benedetti L, et al. Rituximab versus placebo for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a randomized trial. *Brain*. 2025;148(4):1112-1121.
80. Howard JF Jr, Bril V, Vu T, Karam C, Peric S, Margania T, et al. Safety, efficacy, and tolerability of efgartigimod in patients with generalised myasthenia gravis (ADAPT): a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*. 2021;20(7):526-536.
81. Allen JA, Lin J, Basta I, Dysgaard T, Eggers C, Guptill JT, et al. Safety, tolerability, and efficacy of subcutaneous efgartigimod in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ADHERE): a multicentre, randomised-withdrawal, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol*. 2024 Oct 1;23(10):1013–24.

82. Querol LA, Hartung HP, Lewis RA, van Doorn PA, Hammond TR, Atassi N, et al. The Role of the Complement System in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy: Implications for Complement-Targeted Therapies *Neurotherapeutics*. 2022;19(3):864-873.
83. Querol L, Lewis RA, Hartung HP, Van Doorn PA, Wallstroem E, Luo X, et al. An innovative phase 2 proof-of-concept trial design to evaluate SAR445088, a monoclonal antibody targeting complement C1s in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2023 June 1;28(2):276–85.
84. Martín-Aguilar L, Lleixà C, Pascual-Goñi E. Autoimmune nodopathies, an emerging diagnostic category. *Curr Opin Neurol*. 2022;35(5):579-585.
85. Devaux JJ, Miura Y, Fukami Y, Inoue T, Manso C, Belghazi M, et al. Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*. 2016;86(9):800-807.
86. Pascual-Goñi E, Fehmi J, Lleixà C, Martín-Aguilar L, Devaux J, Höftberger R et al. Antibodies to the Caspr1/contactin-1 complex in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain*. 2021;144(4):1183-1196.
87. Gupta P, Mirman I, Shahar S, Dubey D. Growing Spectrum of Autoimmune Nodopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2023;23(5):201-212.
88. Uncini A, Vallat JM. Autoimmune nodo-paranodopathies of peripheral nerve: the concept is gaining ground. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(6):627-635.
89. Martinez-Martinez L, Lleixà MC, Boera-Carnicero G, Cortese A, Devaux J, Siles A, et al. Anti-NF155 chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy strongly associates to HLA-DRB15. *J Neuroinflammation*. 2017 Nov 16;14(1):224.
90. Martín-Aguilar L, Lleixà C, Pascual-Goñi E, Caballero-Ávila M, Martínez-Martínez L, Díaz-Manera J, et al. Clinical and Laboratory Features in Anti-NF155 Autoimmune Nodopathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022 Jan 2;9(1).
91. Carrera-García L, Natera-De Benito D, Lleixà C, Ortez C, Colomer J, Nascimento A, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with contactin-1 antibodies in a child. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2019;6(5):e60.
92. Dubey D, Honorat JA, Shelly S, Klein CJ, Komorowski L, Mills JR, et al. Contactin-1 autoimmunity: Serologic, neurologic, and pathologic correlates. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(4):e771
93. Cortese A, Lombardi R, Briani C, Callegari I, Benedetti L, Manganelli F, et al. Antibodies to neurofascin, contactin-1, and contactin-associated protein 1 in CIDP: Clinical relevance of IgG isotype. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020 Jan 21;7(1):E639.
94. Appeltshauer L, Brunder AM, Heinius A, Körtvélyessy P, Wandinger KP, Junker R, et al. Antiparanodal antibodies and IgG subclasses in acute autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020 Sept 1;7(5).
95. Taieb G, Le Quintrec M, Pialot A, Szwarc I, Perrochia H, Labauge P, et al. “Neuro-renal syndrom

96. Xu Q, Liu S, Zhang P, Wang Z, Chang X, Liu Y, et al. Characteristics of Anti-Contactin1 Antibody-Associated Autoimmune Nodopathies With Concomitant Membranous Nephropathy. *Front Immunol*. 2021;12:759187.
97. Hashimoto Y, Ogata H, Yamasaki R, Sasaguri T, Ko S, Yamashita K, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with concurrent membranous nephropathy: An anti-paranode and podocyte protein antibody study and literature survey. *Front Neurol*. 2018;9:997.
98. Delmont E, Brodovitch A, Kouton L, Allou T, Beltran S, Brisset M, et al. Antibodies against the node of Ranvier: a real-life evaluation of incidence, clinical features and response to treatment based on a prospective analysis of 1500 sera. *J Neurol*. 2020 Dec 1;267(12):3664–72.
99. Fehmi J, Davies AJ, Antonelou M, Keddie S, Pikkupeura S, Querol L, et al. Contactin-1 links autoimmune neuropathy and membranous glomerulonephritis. *PLoS One*. 2023;18(3):e0281156.
100. Doppler K, Appeltshauser L, Villmann C, Martin C, Peles E, Krämer HH, et al. Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain*. 2016 Oct 1;139(10):2617–30.
101. Appeltshauser L, Junghof H, Messinger J, Linke J, Haarmann A, Ayzenberg I, et al. Anti-pan-neurofascin antibodies induce subclass-related complement activation and nodo-paranodal damage. *Brain*. 2023 May 1;146(5):1932–49.
102. Zhang X, Kira JI, Ogata H, Imamura T, Mitsuishi M, Fujii T, et al. Anti-LGI4 Antibody Is a Novel Juxtaparanodal Autoantibody for Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2023 Mar 11;10(2).
103. Manso C, Querol L, Lleixà C, Poncelet M, Mekaouche M, Vallat JM, et al. Anti-neurofascin-155 IgG4 antibodies prevent paranodal complex formation in vivo. *J Clin Invest*. 2019 June 3;129(6):2222–36.
104. Jentzer A, Attal A, Roué C, Raymond J, Lleixà C, Illa I, et al. IgG4 Valency Modulates the Pathogenicity of Anti-Neurofascin-155 IgG4 in Autoimmune Nodopathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022 Sept 10;9(5).
105. Manso C, Querol L, Mekaouche M, Illa I, Devaux JJ. Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects. *Brain*. 2016 June 1;139(6):1700–12.
106. Taieb G, Jentzer A, Vegezzi E, Lleixà C, Illa I, Querol L, et al. Effect of monovalency on anti-contactin-1 IgG4. *Front Immunol*. 2023;14:1021513
107. Querol L, Rojas-García R, Diaz-Manera J, Barcena J, Pardo J, Ortega-Moreno A, et al. Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015 Oct 1;2(5):e149.
108. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers?. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-466.
109. Herraets IJT, Goedee HS, Telleman JA, Van Eijk RPA, Verhamme C, Saris CGJ, et al. Nerve ultrasound for diagnosing chronic inflammatory neuropathy: A multicenter validation study. *Neurology*. 2020 Sept 22;95(12):E1745–53.

110. Herraets IJT, Goedee HS, Telleman JA, Van Eijk RPA, Van Asseldonk JT, Visser LH, et al. Nerve ultrasound improves detection of treatment-responsive chronic inflammatory neuropathies. *Neurology*. 2020 Apr 7;94(14):E1470–9.
111. Stephan Goedee H, Van Der Pol WL, Hendrikse J, Van Den Berg LH. Nerve ultrasound and magnetic resonance imaging in the diagnosis of neuropathy. *Curr Opin Neurol*. 2018;31(5):526–33.
112. Goedee HS, Jongbloed BA, van Asseldonk JTH, Hendrikse J, Vrancken AFJE, Franssen H, et al. A comparative study of brachial plexus sonography and magnetic resonance imaging in chronic inflammatory demyelinating neuropathy and multifocal motor neuropathy. *Eur J Neurol*. 2017 Oct 1;24(10):1307–13.
113. McKhann GM, Griffin JW, Cornblath DR, Mellits ED, Fisher RS, Quaskey SA. Plasmapheresis and Guillain-Barré syndrome: analysis of prognostic factors and the effect of plasmapheresis. *Ann Neurol*. 1988. 23(4), 347–353.
114. Cornblath DR, Mellits ED, Griffin JW, et al. Motor conduction studies in Guillain-Barré syndrome: description and prognostic value. *Ann Neurol*. 1988;23(4):354-359.
115. Bouchard C, Lacroix C, Planté V, et al. Clinicopathologic findings and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*. 1999;52(3):498-503.
116. Khalil M, Teunissen CE, Lehmann S, Otto M, Piehl F, Ziemssen T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders - towards clinical application. *Nat Rev Neurol*. 2024;20(5):269-287.
117. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders *Nat Rev Neurol*. 2018;14(10):577-589.
118. Gaetani L, Blennow K, Calabresi P, Di Filippo M, Parnetti L, Zetterberg H. Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(8):870-881.
119. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, Manouchehrinia A, Yaldizli Ö, Maceski A, et al. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol*. 2022;21(3):246-257..
120. Aamodt WW, Waligorska T, Shen J, Tropea TF, Siderowf A, Weintraub D, et al. Neurofilament Light Chain as a Biomarker for Cognitive Decline in Parkinson Disease. *Mov Disord*. 2021 Dec 1;36(12):2945–50.
121. Verde F, Steinacker P, Weishaupt JH, Kassubek J, Oeckl P, Halbgebauer S, et al. Neurofilament light chain in serum for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 Feb 1;90(2):157–64.
122. Dopfer EG, Papma JM, de Jong FJ, van Swieten JC, Jiskoot LC, Heller C, et al. Serum neurofilament light chain in genetic frontotemporal dementia: a longitudinal, multicentre cohort study. *Lancet Neurol*. 2019;18(12):1103-1111.

123. Axelsson M, Sjögren M, Andersen O, Blennow K, Zetterberg H, Lycke J. Neurofilament light protein levels in cerebrospinal fluid predict long-term disability of Guillain-Barré syndrome: A pilot study. *Acta Neurol Scand*. 2018 Aug 1;138(2):143–50.
124. Mariotto S, Farinazzo A, Magliozzi R, Alberti D, Monaco S, Ferrari S. Serum and cerebrospinal neurofilament light chain levels in patients with acquired peripheral neuropathies. *J Peripher Nerv Syst*. 2018 Sept 1;23(3):174–7.
125. Martín-Aguilar L, Camps-Renom P, Lleixà C, Pascual-Goñi E, Díaz-Manera J, Rojas-García R, et al. Serum neurofilament light chain predicts long-term prognosis in Guillain-Barré syndrome patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2021 Jan 1;92(1):70–7.
126. Van Tilburg SJ, Teunissen CE, Maas CCHM, Thomma RCM, Walgaard C, Heijst H, et al. Dynamics and prognostic value of serum neurofilament light chain in Guillain-Barré syndrome. *EBioMedicine*. 2024;102:105072.
127. Sandelius Å, Zetterberg H, Blennow K, Adiutori R, Malaspina A, Laura M, et al. Plasma neurofilament light chain concentration in the inherited peripheral neuropathies. *Neurology*. 2018 Feb 6;90(6):e518–24.
128. Carroll AS, Razvi Y, O'Donnell L, Veleva E, Heslegrave A, Zetterberg H, et al. Serum neurofilament light chain in hereditary transthyretin amyloidosis: validation in real-life practice. *Amyloid*. 2024;31(2):95–104.
129. van Lieverloo GGA, Wieske L, Verhamme C, Vrancken AFJ, van Doorn PA, Michalak Z, et al. Serum neurofilament light chain in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2019 June 1;24(2):187–94.
130. Godelaine J, De Schaepdryver M, Bossuyt X, Van Damme P, Claeys KG, Poesen K. Prognostic value of neurofilament light chain in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain Commun*. 2021;3(1):fcab018.
131. Abdelhak A, Petermeier F, Benkert P, Schädelin S, Oechtering J, Aleksandra ;., et al. Serum neurofilament light chain reference database for individual application in paediatric care. *Lancet Neurol*. 2023;22(9):826-833.
132. Keddie S, Smyth D, Keh RYS, Chou MKL, Grant D, Surana S, et al. Peripherin is a biomarker of axonal damage in peripheral nervous system disease. *Brain*. 2023 Nov 1;146(11):4562–73.
133. Kamil K, Yazid MD, Idrus RBH, Das S, Kumar J. Peripheral Demyelinating Diseases: From Biology to Translational Medicine. *Front Neurol*. 2019;10:87. Published 2019 Mar 19.
134. Wang Y, Sun S, Zhu J, Cui L, Zhang HL. Biomarkers of Guillain-Barré Syndrome: Some Recent Progress, More Still to Be Explored. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:564098.
135. Capodivento G, Visigalli D, Garnerò M, Fancellu R, Ferrara MD, Basit A, et al. Sphingomyelin as a myelin biomarker in CSF of acquired demyelinating neuropathies. *Sci Rep*. 2017;7(1):7831.

136. Capodivento G, De Michelis C, Carpo M, Fancellu R, Schirinzi E, Severi D, et al. CSF sphingomyelin: A new biomarker of demyelination in the diagnosis and management of CIDP and GBS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2021 Mar 1;92(3):303–10.
137. Durbec P, Gennarini G, Goridis C, Rougon G. A Soluble Form of the F3 Neuronal Cell Adhesion Molecule Promotes Neurite Outgrowth. *J Cell Biol*. 1992;117(4):877-887
138. van Lierop ZYGJ, Wieske L, Koel-Simmelink MJA, Chatterjee M, Dekker I, Leurs CE, et al. Serum contactin-1 as a biomarker of long-term disease progression in natalizumab-treated multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2022 Jan 1;28(1):102–10.
139. van Lierop ZYGJ, Noteboom S, Steenwijk MD, van Dam M, Toorop AA, van Kempen ZLE, et al. Neurofilament-light and contactin-1 association with long-term brain atrophy in natalizumab-treated relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2022 Dec 1;28(14):2231–42.
140. Wieske L, Martín-Aguilar L, Fehmi J, Lleixà C, Koel-Simmelink MJA, Chatterjee M, et al. Serum Contactin-1 in CIDP: A Cross-Sectional Study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021 Sept 20;8(5).

